

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Departamento de Biología Molecular



**Diferencias sexuales y regulación de la ruta de
Notch durante la gliosis reactiva**

Estefanía Acaz Fonseca

Madrid, 2015

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Facultad de Ciencias

Departamento de Biología Molecular



**Diferencias sexuales y regulación de la ruta de Notch
durante la gliosis reactiva**

Memoria presentada por Estefanía Acaz Fonseca (Licenciada en Biología),
bajo la dirección de los doctores:

Luis Miguel García Segura
Profesor de Investigación CSIC

M^a Ángeles Arévalo Arévalo
Científica Titular CSIC

Madrid, 2015



MINISTERIO
DE ECONOMÍA
Y COMPETITIVIDAD



CSIC
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



Instituto Cajal, CSIC
Avenida Doctor Arce 37
28002 Madrid

María Ángeles Arévalo Arévalo, Doctora en Ciencias Químicas y Científica
Titular de la Agencia Estatal Consejo Superior de Investigaciones Científicas

Luis Miguel García Segura. Doctor en Ciencias Biológicas y Profesor de
Investigación de la Agencia Estatal Consejo Superior de Investigaciones
Científicas.

CERTIFICAN:

Que Dña. Estefanía Acaz Fonseca, Licenciada en Biología por la Universidad
Complutense de Madrid, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo que lleva
por título:

*“Diferencias sexuales y regulación de la ruta de Notch durante la
gliosis reactiva”*

Consideramos que este trabajo es satisfactorio y apto para su presentación
como Tesis Doctoral en el Departamento de Biología Molecular de la Facultad
de Ciencias de la Universidad Autónoma de Madrid.

Y para que así conste, expedimos el presente certificado en Madrid, a 22 de
Enero de 2015.

Fdo. María Ángeles Arévalo Arévalo
Científica Titular CSIC

Fdo. Luis Miguel García Segura
Profesor de Investigación CSIC

Bueno, aunque ha costado, aquí estoy por fin. Esta tesis habla sobre neurociencia, pero durante estos cinco años de mi vida he aprendido muchas cosas más, y todo es gracias a las personas que me he ido encontrando por el camino.

En primer lugar gracias a mis jefes, Ángeles y Luis Miguel, que me hicieron un hueco en el C-01 sin pensárselo demasiado y espero que no se hayan arrepentido. Ambos habéis estado siempre dispuestos a orientarme y ayudarme en este viaje, con la máxima disponibilidad y una sonrisa en la cara que agradezco de corazón. Gracias por ello, y por formar un grupo en el que impera el trabajo en equipo y el buen rollo, la familia del C-01 (ahora en versión transoceánica).

La mayor parte de mi conocimiento científico y de las lecciones sobre las consecuencias vitales que implica dedicarse a este bonito trabajo se lo debo, sin ninguna duda, a las post-docs de la familia C-01. Yolanda y Jole (tanto monta, monta tanto) actuasteis como mis hermanas mayores en el laboratorio y me aconsejasteis en cada paso. Con Mariana hice un curso intensivo (por la cantidad de horas que pasamos juntas) sobre buenas prácticas en ciencia, sobre esfuerzo y sobre amistad. Ha sido un privilegio trabajar con todas vosotras, vuestra capacidad de lucha demuestra lo duro que es para una mujer dedicarse a la ciencia, siendo honestas a cada paso y dando lo mejor de vosotras mismas. En los momentos más duros de mi tesis siempre habéis estado a mi lado, y vuestro ejemplo me ha impulsado a no tirar la toalla. Os admiro y estáis en mi corazón.

Cuando yo entré en el labo y no tenía ni idea de hacer nada, les tocó a María Santos y a Julica enseñarme, explicarme y aguantarme. Juntas montamos el grupo rebelde que dominaría el mundo desde el cubículo del C-01 (creo que Julia era “Cerebro” y María y yo “Pinkies”), acompañadas de una banda sonora jevi. Ahora que ya os habéis hecho grandes y que hemos apartado el tema de la dominación global a un lado, cada vez que nos reencontramos me seguís enseñando un montón de cosas. Gracias a ambas por vuestra amistad y por seguir cerca a pesar del tiempo transcurrido.

Tras ellas, la siguiente hornada de becarias C-01 es la mía, junto con Isa y Ana. Nosotras tres hemos compartido los nervios de los primeros congresos y artículos, así como las primeras responsabilidades como “profes” y en otras

funciones (muchas desde que no hay técnicos) del labo. No sé si os lo digo lo suficiente, pero vuestro apoyo en todos esos momentos ha sido clave para atreverme a superarlos. Hemos aliviado la presión con terapia grupal, chocolate, música, vídeos tontos de YouTube... y sobretodo con muchas risas. Voy a echaros mucho de menos cuando me vaya, chicas; aunque yo estaré dispuesta a organizar el ratito del té con vosotras siempre que queráis. Os queda por delante la vivencia del último tramo de tesis; no entréis en pánico porque ambas lo vais a superar con creces. Aquí me tenéis para lo que haga falta, contad conmigo.

El ciclo de la vida nunca se detiene en el C-01, y las nuevas generaciones de científicos requerían formación. Con mayor o menor acierto, he intentado enseñar algo a Alejandra, Andrea, Juan y Rebe. Espero haberos ayudado en vuestros primeros pasos e inspirado algo de amor por la neurociencia. Desde luego, vosotros me habéis enseñado muchas cosas a mí, como a pensar antes de hablar, a explicar las cosas con calma y a desarrollar mi paciencia. Rebe, me has ayudado con muchos experimentos en la época en la que más lo necesitaba y unos cuantos resultados de esta tesis derivan del buen trabajo que has hecho. Con gente como tú da gusto trabajar, y seguro que sea cual sea tu siguiente destino, valorarán tus aptitudes como mereces y te harás imprescindible para ellos. Ahora empieza la era de Ana O, que has demostrado tus ganas de aprender desde el principio y que conseguirás todo lo que te propongas. Cuando yo estaba un poco cansada de la rutina, ver vuestra alegría al conseguir hacer vuestro primer Western siempre me hizo redescubrir mi amor por la profesión y me animó a continuar. Gracias a todos.

El intercambio cultural es otra máxima del C-01, y gracias a ello he podido conocer a excelentes personas de distintos países y culturas. De Italia vinieron Elisabetta, Daniela y Alicia (alicantina con influencias itálicas). Dani, hemos compartido menos tiempo en el laboratorio pero las cenas y cañas cuentan mucho más. Siempre dispuesta a ayudar y a enseñar, gracias por todo. Ali, llegaste como un torbellino al laboratorio y nos enamoraste a todos, aunque al principio yo me sintiera intimidada. Tu alegría es contagiosa y da gusto compartir un rato contigo en cualquier ambiente. Argentina también ha aportado grandes figuras al C-01, como Ezequiel, Julia Scerbo y Carla. Todos endulzasteis nuestros oídos con vuestro acento (aunque tuvimos que hacer un esfuerzo extra

para entender a Julia) y algunas de vuestras expresiones que se han quedado para siempre conmigo. Samar aportó el toque exótico a la familia y nos demostró lo lejos que se puede llegar a base del esfuerzo y del buen trabajo. Gracias por toda tu ayuda y por esas charlas de desahogo cuando éramos las últimas en el laboratorio. Nuestros brasis, Claudia y Bruno, también han traído aire fresco este último año. Siempre con ganas de aprender y ayudar, ha sido un placer compartir la campana F con vosotros (siempre que su dueño nos la dejaba usar, claro). Seguid con esa actitud positiva, que os ayudará a lograr cualquier objetivo que os proponáis.

La lista de miembros del C-01 es interminable, así que resumo dando las gracias a todos porque cada uno habéis puesto vuestro granito de arena en esta tesis de un modo u otro: Cris, Paloma (mi maestra de lesiones), Olga, María Mouriño (maestra de cultivos), Elisa, Víctor, Ceren, Cat, Virginia, Óscar, Olivia, Helen, Insaaf, Ale López y Sandra. Gracias también a Íñigo y María, siempre que he tenido cualquier duda habéis estado dispuestos a resolverla y a charlar sobre ciencia. Gracias a Julie y todo el grupo del hospi, por sus buenos consejos durante los seminarios.

Fuera del C-01 las conversaciones sobre ciencia y vida han seguido, gracias a la inestimable compañía de mi amiga Vir. Nuestros caminos han sido paralelos hasta ahora, pero aunque dejemos de vivir a cinco minutos una de la otra seguiremos igual de unidas. Siempre podrás contar conmigo y sé que yo contigo también, así que no hacen falta más palabras para darte las gracias por tu amistad.

Por si fuera poco todo lo anterior, además tengo grandes amigos en otras ciudades, soy una persona afortunada. Las dos Maites, bellas personas donde las haya, también me han escuchado mucho a lo largo de esta etapa de mi vida y siempre tendrán un hueco en mi casa y en mi corazón. Toda la cuadrilla de Pamplona que siempre preguntáis: “¿qué tal lo tuyo?”, aunque no vayáis a entender la respuesta, gracias. A Sandrica, que es mi hermana adoptiva, gracias por estar siempre ahí y por ser siempre tú misma.

Mi familia es la mejor del mundo, y punto. Mis padres me han animado a soñar y a luchar por lo que quiero, aunque eso implique estar lejos de ellos y

echarlos de menos. Gracias por educarme en la humildad y en el esfuerzo, que son las mejores herramientas para pelear en esta vida; y por enseñarme con vuestro ejemplo que lo importante es ser buena persona. Mis hermanas son amigas, confidentes y asesoras; cada una con nuestro carácter, hemos aprendido a entendernos, aunque no siempre nos pongamos de acuerdo. Gracias a todos por entender que no siempre haya podido estar allí con vosotros, vuestro amor incondicional me ha enseñado a querer libremente.

Urtzi, eres el anclaje de mi vida y mi hogar estará donde tú estés. Has tenido más paciencia que nadie en todo este tiempo, pero nuestra aventura común ya está en marcha y nos depara muchas cosas buenas.

¡Gracias a todos!

“No temas a las dificultades: lo mejor surge de ellas”

Rita Levi-Montalcini

Las células de glía son las encargadas del mantenimiento de la homeostasis en el sistema nervioso central (SNC). Ante un estímulo lesivo, estas células emiten una respuesta organizada espaciotemporalmente, conocida como gliosis reactiva, cuya función principal es la protección de las células en riesgo. Sin embargo, la gliosis reactiva también incluye procesos inflamatorios, por lo que su regulación fina es imprescindible para evitar la cronificación de la neuroinflamación. La inflamación crónica del SNC subyace como principal característica de muchas enfermedades neurodegenerativas, en las que se han detectado diferencias sexuales en incidencia y progresión. En la primera parte de este trabajo estudiamos las diferencias sexuales en la gliosis reactiva, como posible factor relevante en la génesis de las diferencias sexuales en las enfermedades neuroinflamatorias y/o neurodegenerativas. En un modelo de lesión cortical penetrante no se encontraron diferencias en el número o reactividad de la astroglia; pero los astrocitos de machos expresaban en mayor proporción CCL2, proteína que regula el reclutamiento de células del sistema inmunológico y la reactividad glial. En la zona más próxima a la lesión los machos mostraban una mayor cantidad de células de microglía, y con características propias de un perfil más neuroprotector (menos proinflamatorio) que la microglía de hembras. Estas diferencias en la zona próxima a la lesión fueron acompañadas de una mayor supervivencia neuronal en machos que en hembras.

Con el objetivo de profundizar en las causas moleculares de las diferencias sexuales en la respuesta glial se empleó un modelo de astrogliosis *in vitro* inducida por el lipopolisacárido bacteriano (LPS). En dicho modelo se estudió la regulación de la ruta de Notch por parte del LPS, y de diversas hormonas con funciones neuroprotectoras como los compuestos estrogénicos, la progesterona y el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1). El LPS redujo la actividad de la ruta de Notch mediante dos mecanismos moleculares distintos; el IGF-1 revirtió totalmente, y los compuestos estrogénicos parcialmente, los efectos del LPS sobre la ruta. Dicha ruta no media la producción de citoquinas proinflamatorias, ni los cambios morfológicos, ni la proliferación de los astrocitos expuestos al estímulo inflamatorio.

Glial cells are responsible of homeostasis maintenance in the central nervous system (CNS). When facing a harmful stimulus in the CNS, glial cells generate a spatiotemporally organized response, known as reactive gliosis, which main objective is to protect endangered or stressed cells. However, and given that reactive gliosis also implies inflammatory processes, its fine regulation is essential to prevent the chronification of neuroinflammation. Chronic inflammation in the CNS underlies as the main characteristic of several neurodegenerative diseases, in which sex differences in their incidence or progression have been detected. In the first part of the present work sex differences in reactive gliosis were studied, given their possible role in the generation of sex differences in neuroinflammatory or neurodegenerative diseases. In the cortical stab wound injury model no sex differences were found in the number or reactive status of astroglia, but astrocytes from males expressed CCL2 (involved in immune cells recruitment and glial reactivity) in a higher frequency than astrocytes from females. In the closest area to the wound edge males presented more microglial cells than females and those cells from males displayed a more neuroprotective-biased profile than microglia from females. These differences in the glial response to the injury were accompanied by a higher neuronal survival in males than in females.

In order to deeply analyze the molecular causes of sex differences in glial response, an *in vitro* model of lipopolysaccharide (LPS)-induced astrogliosis was used. In that model, we studied the Notch signaling pathway regulation by LPS and by different neuroprotective hormones, such as estrogens, progesterone and the insulin-like growth factor 1 (IGF-1). LPS downregulated the Notch signaling pathway, acting through two different molecular mechanisms. These effects were completely reverted by IGF-1, whereas estrogenic compounds were only able to revert part of them. Notch pathway is not involved in proinflammatory cytokines production, nor in the morphological changes, neither in the proliferative effects of astrocytes exposed to LPS.

INTRODUCCIÓN	5
1. INFLAMACIÓN EN EL SISTEMA NERVIOSO	7
1.1. NEUROINFLAMACIÓN Y CÉLULAS DE GLÍA	7
1.2. DIFERENCIAS SEXUALES EN ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS	9
2. EFECTOS ANTIINFLAMATORIOS DE LAS HORMONAS SEXUALES Y DEL IGF-1	11
2.1. SÍNTESIS DE LOS ESTEROIDES SEXUALES Y DEL IGF-1 EN EL SNC	11
2.2. MECANISMOS DE ACCIÓN DE LAS HORMONAS SEXUALES Y DEL IGF-1	12
2.3. FUNCIONES DE LAS HORMONAS SEXUALES Y DEL IGF-1 EN EL SNC: NEUROPROTECCIÓN.	14
2.4. MECANISMOS MOLECULARES DE NEUROPROTECCIÓN POR HORMONAS SEXUALES E IGF-1	16
3. LA RUTA DE SEÑALIZACIÓN DE NOTCH	17
3.1. MECANISMOS DE SEÑALIZACIÓN DE NOTCH Y SU REGULACIÓN	17
3.2. FUNCIONES DE LA RUTA DE NOTCH EN EL SISTEMA NERVIOSO	21
4. JUSTIFICACIÓN DE LOS OBJETIVOS DE LA TESIS	22
OBJETIVOS	25
MATERIALES Y MÉTODOS	29
1. LESIÓN CEREBRAL PENETRANTE	31
2. INMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ)	32
2.1. IHQ SIMPLE (REVELADA CON DAB)	32
2.2. IHQ DE FLUORESCENCIA	33
3. ANÁLISIS MORFOMÉTRICO	34
4. CULTIVOS PRIMARIOS DE GLÍA ENRIQUECIDOS EN ASTROCITOS	34
5. TRATAMIENTOS CELULARES	36
6. VIABILIDAD CELULAR	36
7. TRANSFECCIÓN	37
8. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE RT-qPCR	37
9. WESTERN BLOT	38
10. INMUNOPRECIPITACIÓN DEL RECEPTOR DE IGF-1	40
11. ANÁLISIS DEL CICLO CELULAR MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO	40
12. INMUNOCITOQUÍMICA	41
12.1. ANÁLISIS MORFOLÓGICO Y PUREZA DEL CULTIVO	41
12.2. ANÁLISIS DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR	42
13. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	42
RESULTADOS	45
I. DIFERENCIAS SEXUALES EN NEUROINFLAMACIÓN (IN VIVO)	47
1. RESPUESTA DE LA MICROGLÍA A LA LESIÓN PENETRANTE	47

2. RESPUESTA DE LA ASTROGLÍA A LA LESIÓN PENETRANTE	53
3. SUPERVIVENCIA NEURONAL	56
II. RUTAS DE SEÑALIZACIÓN IMPLICADAS EN LA INFLAMACIÓN (<i>IN VITRO</i>)	60
1. REGULACIÓN DE LA RUTA DE NOTCH EN INFLAMACIÓN	60
1.1. MODELO DE ASTROGLIOSIS <i>IN VITRO</i>	60
1.2. MODELO DE LESIÓN PENERANTE <i>IN VIVO</i>	66
2. MODULACIÓN DE LA RUTA DE NOTCH POR AGENTES ANTI-INFLAMATORIOS Y NEUROPROTECTORES	67
2.1. 17 β -ESTRADIOL	67
2.2. MODULADORES SELECTIVOS DE LOS RECEPTORES DE ESTRÓGENOS (SERMs)	71
2.3. PROGESTERONA	72
2.4. FACTOR DE CRECIMIENTO INSULÍNICO TIPO 1 (IGF-1)	73
3. REGULACIÓN DE LA RUTA DE NOTCH POR IGF-1	77
4. POSIBLES FUNCIONES DE LA RUTA DE NOTCH DURANTE PROCESOS INFLAMATORIOS EN ASTROCITOS	81
4.1. REGULACIÓN DE NF-KB Y PRODUCCIÓN DE CITOQUINAS	81
4.2. MORFOLOGÍA CELULAR Y CITOESQUELETO	83
4.3. PROLIFERACIÓN CELULAR	84
DISCUSIÓN	87
I. DIFERENCIAS SEXUALES EN NEUROINFLAMACIÓN (<i>IN VIVO</i>)	89
II. IMPLICACIÓN DE LA RUTA DE SEÑALIZACIÓN DE NOTCH EN LA NEUROINFLAMACIÓN	93
1. CARACTERIZACIÓN DEL MODELO	93
2. ESTUDIO DE LA RUTA DE NOTCH EN LA NEUROINFLAMACIÓN	96
3. REGULACIÓN DE LA RUTA DE NOTCH POR AGENTES ANTI-INFLAMATORIOS Y NEUROPROTECTORES	99
4. FUNCIONALIDAD DE LA RUTA DE NOTCH DURANTE LA ASTROGLIOSIS REACTIVA	102
CONCLUSIONES	107
BIBLIOGRAFÍA	113

AR receptor de andrógenos

Arg-1 arginasa-1

ARNm ácido ribonucleico mensajero

BDNF factor de crecimiento derivado de cerebro

CCL2 ligando 2 de quemoquinas con motivos C-C

CNTF factor neurotrófico ciliar

CSPG proteoglicanos de condroitín sulfato

Dlk *Delta-like homologue*

Dll *Delta-like*

EAE encefalomiелitis autoinmune experimental

ER receptor de estrógenos

GFAP proteína fibrilar glial ácida (*glial fibrillary acidic protein*)

GLAST (EAAT1) transportador de glutamato y aspartato

GLT-1 (EAAT2) transportador de glutamato glial

Glut glutamato

GPER receptor de estrógenos acoplado a proteína G

GR receptor de glucocorticoides

Hes *hairy and enhancer of split*

Iba1 molécula ionizada adaptadora de unión a calcio 1 (*ionized calcium-binding adapter molecule 1*)

IGF-1 factor de crecimiento insulínico tipo 1 (*insulin like growth factor 1*)

IGF1R receptor de IGF-1

IL interleuquina

INF- γ interferón γ

iNOS óxido nítrico sintasa inducible.

Jag Jagged

LPS lipopolisacárido

LTZ letrozol

MAPK MAP quinasas (*Mitogen activated protein kinases*)

MCAO oclusión de la arteria cerebral media

MHC-II complejo mayor de histocompatibilidad II

MMP metaloproteasa

NF- κ B factor nuclear κ B

Ngb neuroglobina

NGF factor de crecimiento nervioso

NICD fragmento intracelular del receptor Notch (*Notch intracellular domain*)

NO óxido nítrico

NRs receptores nucleares

P progesterona

PDGF factor de crecimiento derivado de plaquetas

PGE2 prostaglandina E2

PI3K fosfoinositol 3 quinasa

PR receptor de progesterona

ROS especies reactivas de oxígeno

RT-qPCR reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real

SERM modulador selectivo de los receptores de estrógenos

SNC sistema nervioso central

TGF- β factor de crecimiento transformante β

TNF- α factor de necrosis tumoral α

YM-1 proteína similar a quitinasa 3

INTRODUCCIÓN



1. INFLAMACIÓN EN EL SISTEMA NERVIOSO

1.1. Neuroinflamación y células de glía

Las células de glía son las encargadas del mantenimiento de la homeostasis en el SNC. Por lo tanto, entre otras muchas funciones, son las encargadas de defender la integridad del tejido cuando éste experimenta cualquier tipo de daño. La gliosis reactiva o reactividad glial es una respuesta compleja que ocurre en varias etapas, que depende del tipo de patología que la desencadena y del contexto molecular, y que implica numerosos cambios moleculares y morfológicos en las células gliales (ver Tabla 1). Es una respuesta defensiva, encaminada a proteger a las neuronas estresadas (y al cerebro en general), a aislar la zona lesionada, a eliminar patógenos, células moribundas y restos celulares, y a remodelar el tejido nervioso tras la resolución de la patología (Braun et al. 2009; Peng et al. 2014).

Tipo Celular	Citoesqueleto	Proliferación y migración	Fagocitosis	Presentación de antígeno	Otros marcadores
Microglía	Hipertrofia y cambio morfológico	Aumentada	Reducida en M1, aumentada en M2	Aumentada. (MHC-II, CD80/86)	M1: iNOS, CD16/32, CD11b, GR M2: Arg-1, YM-1, MR, Fizz-1
Astrocitos	Hipertrofia y cambio morfológico	Aumentada	Sí	Sólo en inflamación crónica o severa (MHC-II)	Sobreexpresión de GFAP. Expresión de vimentina, nestina y S-100β.

Tabla 1: Características generales de la gliosis reactiva, algunas de las cuales pueden usarse como marcadores celulares. GR, receptor de glucocorticoides. Arg-1, arginasa-1. YM-1, proteína similar a quitinasa tipo 3. MR, receptor de mineralocorticoides.

En el caso de una lesión cerebral localizada, se desencadenan numerosos eventos moleculares y celulares en las células gliales que evolucionan a lo largo de varias semanas (Burda and Sofroniew 2014). En primer lugar la microglía migra desde otras áreas cerebrales hasta el tejido lesionado, donde comienza a proliferar y a producir una gran diversidad de citoquinas proinflamatorias. Esto conduce al reclutamiento de células circulantes del sistema inmunológico y de astrocitos, que se activarán y comenzarán a formar la cicatriz glial (Ridet et al. 1997; Fawcett and Asher 1999; Hanisch and Kettenmann 2007). Esta primera etapa del proceso inflamatorio es una respuesta ofensiva que se centra en eliminar los patógenos y restos celulares derivados de la muerte celular inicial, pero puede poner en riesgo la integridad de algunas neuronas (muerte celular secundaria) si no es controlada. Los astrocitos

generan la cicatriz glial en torno al foco de la lesión, constituyendo una barrera de contención para evitar la expansión de la inflamación hacia el tejido sano colindante; así inicia la segunda fase de la respuesta inflamatoria, centrada en la reparación del área cerebral dañada. Sin embargo, dicha cicatriz también supone un impedimento para la regeneración axonal y la total recuperación de la conectividad neuronal (Voskuhl et al. 2009; Cregg et al. 2014).

Por ello la neuroinflamación puede considerarse como un arma de doble filo: es un proceso fisiológico necesario para la reparación de los tejidos, pero también puede inducir la muerte en determinadas células. A su vez, las células responsables de la inflamación también muestran un carácter dual, dependiendo de la batería de moléculas que expresen (Hu et al. 2015; Pekny et al. 2014). Cuando los macrófagos o las células microgliales se activan pueden adquirir un fenotipo molecular claramente pro-inflamatorio (conocido como activación clásica o M1), que juega un papel importante en la primera fase del proceso inflamatorio y que contribuye a la reactividad astrocitaria y a la formación de la cicatriz glial. Alternativamente estas células pueden polarizarse hacia el fenotipo M2, que contribuye a reducir la inflamación y a la reparación del tejido dañado (Hanisch and Kettenmann 2007; Kigerl et al. 2009; Schwartz and Shechter 2010). No se conocen con exactitud los estímulos responsables del viraje del fenotipo M1 al M2, que sufren estas células conforme avanza el proceso inflamatorio; pero el tipo de macrófagos reclutados hacia el tejido dañado depende del microambiente molecular en la zona de la cicatriz glial (Rolls et al. 2008, 2009; Shechter and Schwartz 2013). Por su parte, los astrocitos también muestran gran heterogeneidad molecular en función de su localización respecto del foco de la lesión (Wanner et al. 2013; Anderson et al. 2014; Cregg et al. 2014).

Astroglía y microglía liberan moléculas de señalización muy similares en el área lesionada (Tabla 2), que regulan su propia respuesta inflamatoria y además establecen un diálogo con el resto de células del tejido y con la matriz extracelular (Buffo et al. 2010; Gao et al. 2013). Por ejemplo, estudios recientes han demostrado que la expresión de CCL2 (ligando 2 de quemoquinas con motivos C-C) en los astrocitos está implicada en el reclutamiento de células del sistema inmunológico y regula la reactividad de astrocitos y microglía (Selenica et al. 2013; Kim et al. 2014).

	ASTROCITOS	MICROGLÍA
Citoquinas Pro-inflamatorias	IL-6, IL-1, TGF- β , TNF- α , INF- γ	TNF- α , INF- γ , IL-12, IL-1 β , IL-23
Otras sustancias citotóxicas	ATP, ROS, Glut; NO	ROS, NO
Citoquinas Anti-inflamatorias	PGE2, IL-4	IL-10, IL-4, IL-3, TGF- β
Factores Neurotróficos	IGF-1, NGF, BDNF, CNTF, neurotrofina 3	IGF-1, BDNF, PDGF
Matriz Extracelular	Inhibición del crecimiento axonal: CSPG, tenascinas, colágeno, Semaforina 3, MMPs	Remodelación (MMP9)
Angiogénesis	MMP9	Promovida por M2
Barrera Hematoencefálica	Reparación	
Otras funciones beneficiosas	Recaptura de Glutamato, reducción de la oxidación	

Tabla 2. Moléculas liberadas por las células de glía ante un daño tisular en el SNC y sus funciones. IL, interleuquina. TGF- β , factor de crecimiento transformante β . INF- γ , interferón γ . ROS, especies reactivas de oxígeno. Glut, glutamato. NO, óxido nítrico. PGE2, prostaglandina E2. IGF-1, factor de crecimiento insulínico tipo 1. NGF, factor de crecimiento nervioso. BDNF, factor neurotrófico derivado de cerebro. CNTF, factor neurotrófico ciliar. PDGF, factor de crecimiento derivado de plaquetas. CSPG, proteoglicanos de condroitín sulfato. MMP metaloproteasas que modifican componentes de la matriz extracelular.

Así, alteraciones en la composición del microambiente molecular que se genera en torno a la lesión podrán modular la respuesta inflamatoria de las células gliales y, por lo tanto, el tiempo y consecuencias de la resolución de la patología. Por ello se hace necesaria la detección de dianas moleculares que regulen de manera precisa la reactividad glial, favoreciendo los aspectos reparadores de la gliosis y controlando la amplificación de la inflamación.

1.2. Diferencias sexuales en enfermedades neurodegenerativas

Existen diferencias sexuales en la incidencia, edad de aparición, progreso e intensidad de muchas enfermedades neurodegenerativas. Por ejemplo, las mujeres tienen una probabilidad mayor de padecer la enfermedad de Alzheimer (Fratiglioni et al. 1997; Andersen et al. 1999), esclerosis múltiple (Noonan et al. 2002; Orton et al. 2006; Schwendimann and Alekseeva 2007) y otras enfermedades autoinmunes (Jacobson et al. 1997; Dooley and Hogan 2003; Gleicher and Barad 2007) que los hombres. Todas estas patologías presentan una característica fisiopatológica en común: la neuroinflamación crónica. Por lo tanto, la relevancia de las células de glía en la patogénesis de estas enfermedades es cada vez mayor (Li et al. 2011; Fu and Jhamandas 2014); y el control de los procesos inflamatorios en el SNC se postula como

una diana terapéutica importante para frenar el avance de estas enfermedades neurodegenerativas (Chakraborty et al. 2010; Schwartz and Shechter 2010).

En los últimos años varios estudios se han centrado en los dimorfismos sexuales de las células gliales, tanto en el SNC sano como en condiciones patológicas. Existen diferencias sexuales en número, morfología y fenotipo molecular de la microglía en condiciones fisiológicas. Dichas diferencias van evolucionando a lo largo del desarrollo y podrían explicar las diferentes vulnerabilidades que muestra cada uno de los sexos para sufrir determinadas patologías, en cada etapa del desarrollo (Mouton et al. 2002; Schwarz and Bilbo 2012; Schwarz et al. 2012; Lenz and McCarthy 2014). También se han detectado diferencias sexuales en la respuesta inflamatoria de los astrocitos *in vitro*; ante el mismo estímulo, las células derivadas de machos muestran una mayor producción de citoquinas proinflamatorias que las de hembras (Santos-Galindo et al. 2011; Astiz et al. 2014). Además, los astrocitos presentan una resistencia sexodimórfica al estrés oxidativo y a la privación de oxígeno y glucosa (Liu et al. 2007). Dado que las células de glía son las principales responsables de la neuroinflamación, el concepto de las diferencias sexuales en la glía como base de las diferencias sexuales en las enfermedades neurodegenerativas va ganando peso. Conocer en detalle los mecanismos moleculares que conforman la gliosis reactiva para una determinada patología permitirá descubrir el origen de las diferencias sexuales en la glía, y por lo tanto de la neuroinflamación.

El origen de las diferencias sexuales en las enfermedades neurodegenerativas (y en las células de glía) puede deberse a razones fisiológicas (los cromosomas sexuales, sus genes asociados y las hormonas reproductivas) o a razones ambientales (Lenz et al. 2012). De todos estos factores, el endocrino es el que más se ha estudiado. Por ejemplo, se postula que las diferencias en niveles locales de neuroesteroides parecen ser la causa de las diferencias sexuales en: frecuencia de aparición y daño causado por algunos tipos de epilepsia (Reddy 2014), incidencia de Alzheimer (Barron and Pike 2012) y Parkinson (Shulman and Bhat 2006). Por todo esto, cada vez más se considera la posibilidad de usar las hormonas sexuales como terapia específica para cada sexo contra dichas patologías del SNC (Melcangi and Garcia-Segura 2010; Gillies and McArthur 2010; Giatti et al. 2012; Stein 2013).

2. EFECTOS ANTIINFLAMATORIOS DE LAS HORMONAS SEXUALES Y DEL IGF-1

2.1. Síntesis de los esteroides sexuales y del IGF-1 en el SNC

El cerebro es un órgano endocrino, que sintetiza y es diana de múltiples hormonas. Además de las neurohormonas hipofisarias clásicas, el cerebro sintetiza y responde a las hormonas sexuales (progesterona, testosterona, estradiol) y sus metabolitos, así como al factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1).

Las hormonas sexuales son esteroides neuroactivos sintetizados a partir del colesterol en las gónadas, glándulas adrenales y en el SNC (Baulieu 1997). El proceso de esteroidogénesis comienza con la transformación mitocondrial del colesterol en pregnenolona, a partir de la cual pueden sintetizarse la progesterona o la testosterona. A su vez, la testosterona puede ser convertida en estradiol por la enzima aromatasa (también conocida como estrógeno sintetasa) (Simpson et al. 1994). La expresión de las enzimas necesarias para la esteroidogénesis se ha detectado en muchas áreas del sistema nervioso central y periférico, por lo que parece que la esteroidogénesis es un proceso generalizado en el cerebro (Lavaque, Sierra, et al. 2006; Stanić et al. 2014). En condiciones fisiológicas parece que las neuronas son las células encargadas de dicha tarea, pero ante cualquier daño en el tejido nervioso se produce un incremento en la esteroidogénesis local que involucra a neuronas y células gliales (Garcia-Segura et al. 1999; Lavaque, Mayen, et al. 2006; Mirzatonni et al. 2010; Guennoun et al. 2014). La expresión de receptores de estrógenos y de progesterona se detecta en prácticamente todos los tipos de células del SNC (neuronas, astrocitos, microglía, oligodendrocitos y células endoteliales), mientras que el receptor de andrógenos es más bien neuronal (Garcia-Segura et al. 1995; Mong et al. 2002; Stirone et al. 2003; Tapia-Gonzalez et al. 2008; Dart et al. 2013; Guennoun et al. 2014).

Por otra parte, el IGF-1 es un péptido neuroactivo sintetizado fundamentalmente en el hígado, aunque también se sintetiza en otros órganos, incluyendo el SNC. La expresión del IGF-1 y su receptor (IGF1R) se extiende por muchas áreas del SNC, desde el desarrollo embrionario hasta la edad adulta. La síntesis cerebral de esta hormona presenta un pico máximo de producción en edad perinatal, se mantiene bajo durante toda la vida adulta y declina drásticamente en la vejez (Bach

et al. 1991; García-Segura et al. 1991; Bondy and Lee 1993). Del mismo modo que sucede con los esteroides sexuales, ante cualquier tipo de lesión cerebral se aprecia un incremento local en la expresión del IGF-1 y de su receptor en neuronas y células gliales (García-Estrada et al. 1992; Guthrie et al. 1995; Walter et al. 1997).

2.2. Mecanismos de acción de las hormonas sexuales y del IGF-1

2.2.1. Mecanismos de acción de las hormonas sexuales

Debido a su naturaleza esteroidea, las hormonas sexuales pueden atravesar la membrana plasmática con facilidad y unirse a sus correspondientes receptores intracelulares. Estos pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares (NRs), que son factores de transcripción activados por ligando. Tras la unión del ligando, los NRs se unen a elementos de respuesta específicos del ADN en la región reguladora de los genes sensibles a cada uno de los ligandos, y modifican su transcripción mediante el reclutamiento de cofactores que modularán la cromatina. En función del repertorio de cofactores presentes en cada tipo celular, la respuesta de un mismo ligando actuando a través de un mismo receptor puede ser ligeramente distinta en cada tejido. Entre estos NRs encontramos a los receptores de estrógenos alfa y beta ($ER\alpha$ y $ER\beta$), al receptor de progesterona (PR) y al receptor de andrógenos (AR) (Sladek 2011). Estas acciones de las hormonas sexuales mediadas por los NRs fueron las primeras en descubrirse.

Además de estas funciones genómicas clásicas (que pueden tardar entre horas y días en hacerse efectivas), los esteroides sexuales pueden ejercer otras funciones no transcripcionales, y de carácter más rápido (llevan segundos o minutos). Por ejemplo, los receptores de estrógenos anclados a la membrana plasmática, como $ER\alpha$, $ER\beta$, ER-X, el receptor acoplado a proteína G (GPER) y el receptor de membrana acoplado a proteína $G_{\alpha q}$ (G_q -mER); activan cascadas de señalización intracelular tras su unión a ligando (Toran-Allerand et al. 2002; Revankar et al. 2005; Qiu et al. 2008; Ruiz-Palmero et al. 2013). También se han descubierto receptores asociados a la membrana plasmática para progesterona (mPR y Pgmrc) (Singh et al. 2013). Asimismo, otros efectos no genómicos de las hormonas sexuales pueden derivarse de su regulación de la actividad de otro tipo de receptores ($GABA_A$, canales de calcio tipo T, NMDA, P2X)

(Panzica et al. 2012), de sus efectos sobre las membranas mitocondriales (Robertson et al. 2006) o de sus propiedades antioxidantes (Ruiz-Larrea et al. 2000). Los efectos rápidos de los esteroides sexuales suelen ser mediados por las rutas de señalización de PI3K/Akt, ERK 1-2 o JAK/STAT (Arevalo et al. 2015).

2.2.2. Mecanismos de acción del IGF-1

El receptor del IGF-1 (IGF1R) pertenece a la familia de los receptores tirosina quinasa. Es un heterotetrámero formado por dos subunidades extracelulares (subunidades alfa) encargadas de la unión al ligando, y de dos subunidades transmembrana (beta) con dominios tirosina quinasa. Al unirse el ligando los residuos de tirosina son fosforilados y sirven de punto de anclaje para las proteínas adaptadoras IRS 1-4 o Shc, quienes desencadenan la activación de la ruta de PI3K/Akt y de las MAPK (Sehat et al. 2010).

Además de esta ruta de activación clásica, el IGF1R puede ser cortado por el complejo enzimático γ -secretasa (McElroy et al. 2007), acumularse en el núcleo de la célula y actuar como factor de transcripción (Sehat et al. 2010).

2.2.3. Interacción entre estradiol e IGF-1

El estradiol y el IGF-1 comparten algunas funciones en el SNC (ver sección 2.3.), lo que llevó a explorar la idea de una cooperación entre ambas rutas de señalización (Toran-Allerand et al. 1999). Muchas células del cerebro expresan receptores para ambas hormonas (Cardona-Gómez et al. 2000) y se ha demostrado que el ER α forma parte de un complejo macromolecular en el que también se encuentran el IGF1R y sus moléculas adaptadoras (Mendez et al. 2003).

La interacción física de estos receptores afecta a la señalización derivada de su activación (Cardona-Gomez et al. 2002) (Figura 1); lo que también repercute en la consecución de las propiedades neuroprotectoras de ambas hormonas (Azcoitia et al. 1999). Dado que tanto la síntesis como la expresión de los receptores del estradiol y del IGF-1 aumentan tras una lesión cerebral, la producción de estas hormonas por parte de la glía reactiva supone un mecanismo óptimo de señalización neuroprotectora local.

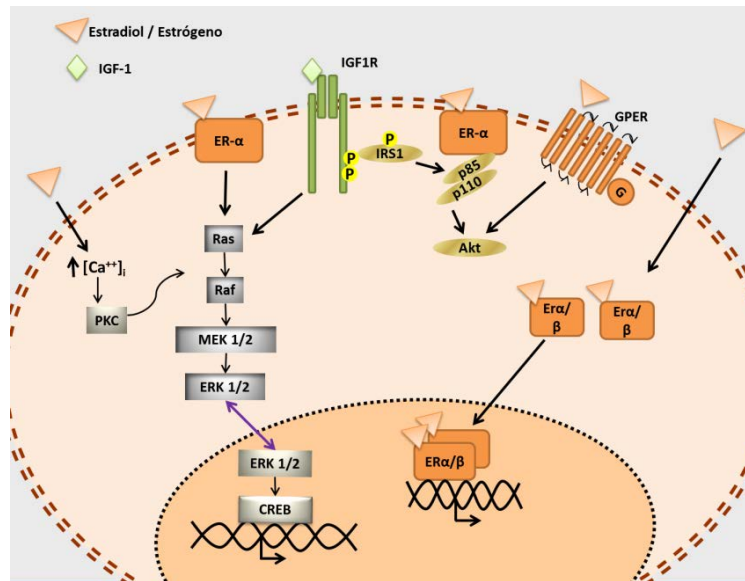


Figura 1. Mecanismos de señalización de los estrógenos y del IGF-1, interacción entre sus rutas.

2.3. Funciones de las hormonas sexuales y del IGF-1 en el SNC: neuroprotección.

La neurobiología de los esteroides sexuales y la del IGF-1 tienen muchos puntos en común. Todas son hormonas con importantes funciones en distintos órganos, pero en el SNC actúan como factores paracrinos y autocrinos. El cerebro es sensible tanto a sus niveles locales como a sus niveles plasmáticos, ya que estas hormonas pueden atravesar la barrera hematoencefálica. Además, todas cumplen numerosas funciones en la fisiología y patología del SNC, y se los considera como factores responsables del mantenimiento de la homeostasis cerebral (Fernandez and Torres-Alemán 2012; Arevalo et al. 2014).

En condiciones fisiológicas el estradiol interviene en la plasticidad sináptica, en la neurogénesis adulta, en la regulación de las emociones y la cognición, en el procesamiento del dolor, así como en los comportamientos reproductivo y agresivo (Dalla et al. 2004; Alexandre-Gomez et al. 2007; Bowers et al. 2010; Cornil et al. 2012; Vierk et al. 2012; Ghorbanpoor et al. 2014). El IGF-1 es fundamental durante todo el desarrollo del SNC, ya que controla la proliferación, diferenciación, migración y supervivencia de casi todos los tipos celulares (Torres-Aleman et al. 1994; D'Ercole et al. 1996; Desai et al. 2011). En el cerebro adulto, el IGF-1 interviene en el control del metabolismo energético, en el aprendizaje, la memoria, plasticidad sináptica y en la

neurogénesis (Nieto-Bona et al. 1997; Anderson et al. 2002; Morton et al. 2006; Llorens-Martín et al. 2010).

Como reguladores homeostáticos que son, tanto las hormonas sexuales como el IGF-1 también cumplen un importante papel en la respuesta celular ante estímulos lesivos en el sistema nervioso. Los primeros indicios de su implicación en patologías del SNC surgieron hace dos décadas, al observar que su síntesis aumentaba en las zonas lesionadas. Posteriormente se ha comprobado que los niveles cerebrales y plasmáticos de progesterona y sus metabolitos (Caruso et al. 2010), de testosterona y 17 β -estradiol (Lopez-Rodriguez et al. 2015), así como de IGF-1 (Steen et al. 2005) se ven alterados en distintos modelos experimentales de daño cerebral.

Éste es un sistema de neuroprotección endógeno, que puede potenciarse aumentando la concentración local de dichos compuestos, mediante su administración con fines terapéuticos. De hecho, el tratamiento con estradiol, testosterona, progesterona o IGF-1 mejora las consecuencias de lesiones traumáticas, de infarto cerebral y de algunas enfermedades neurodegenerativas (ver Tabla 3). El estradiol ha sido el esteroide sexual más estudiado en el campo de la neuroprotección y sus efectos antiinflamatorios han sido ampliamente estudiados en diversos modelos animales. No obstante, su uso en clínica es controvertido, debido a sus acciones periféricas en órganos reproductivos y a su potencial para incrementar el riesgo de cáncer de mama o de endometrio (Folkerd and Dowsett 2013; Brinton and Felix 2014). En ese marco se inició la búsqueda de compuestos que compartieran algunos mecanismos de acción con el estradiol pero que no presentaran sus efectos secundarios adversos. Así surgió el concepto de moduladores selectivos de los receptores de estrógenos (SERMs), moléculas que se unen a los ERs, generando un cambio conformacional en ellos que conduce al reclutamiento de cofactores específicos, y alterando la transcripción de sus genes diana. Debido a la variedad de cofactores presentes en cada tipo celular, y a que cada SERM modifica la estructura tridimensional de los ERs de manera específica, se dice que estas moléculas tienen efectos agonistas, parcialmente agonistas o antagonistas (en comparación con el efecto del estradiol) en cada tipo celular (Smith and O'Malley 2004). Varios SERMs se usan en clínica como terapia contra el cáncer de

mama (tamoxifeno) y contra la osteoporosis (raloxifeno y ospemifeno); sus efectos neuroprotectores se están estudiando todavía (Tabla 3).

Modelo	Tratamiento	Efecto neuroprotector	Referencias
EAE	17 β -estradiol, progesterona y sus metabolitos, IGF-1	Reducción inflamación y astrogliosis, remielinización	(Chesik et al. 2007; Spence et al. 2011; Noorbakhsh et al. 2014)
Lesión penetrante	17 β -estradiol, testosterona, SERMs, IGF-1	Disminución gliosis, recuperación del tejido	(Kazanis et al. 2003; Barreto et al. 2007, 2014; Franco Rodríguez et al. 2013)
Traumatismo craneoencefálico	17 β -estradiol, progesterona	Reducción de: muerte neuronal, edema y daño cognitivo	(Roof et al. 1994; Stein 2001)
Asfixia perinatal	17 β -estradiol	Disminución gliosis, reparación del tejido	(Saraceno et al. 2010)
Infarto (MCAO)	17 β -estradiol, progesterona, IGF-1	Disminución de: edema, inflamación, ROS	(Cai et al. 2011; Habib and Beyer 2015)
Excitotoxicidad (Ácido kaínico)	17 β -estradiol, SERMs, IGF-1	Disminución astrogliosis, prevención muerte neuronal, recuperación funcional	(Ciriza et al. 2004; Liquitaya-Montiel et al. 2012)

Tabla 3. Terapias neuroprotectoras con hormonas sexuales e IGF-1 en distintos modelos experimentales *in vivo* de daño cerebral. EAE, encefalomielitis autoinmune experimental; MCAO, oclusión de la arteria cerebral media; ROS, especies reactivas de oxígeno.

2.4. Mecanismos moleculares de neuroprotección por hormonas sexuales e IGF-1

El efecto neuroprotector de las hormonas sexuales y del IGF-1 se debe a las funciones que ejercen sobre las neuronas (regulación de la señalización para supervivencia fundamentalmente) y, en gran medida, a las que ejercen sobre las células de glía (Arevalo et al. 2012; Acáz-Fonseca et al. 2014). De hecho, la señalización de las hormonas a través de los astrocitos ha demostrado ser imprescindible para mediar algunos de sus efectos neuroprotectores *in vivo* (Spence et al. 2011) e *in vitro* (Genis et al. 2014). Entre las funciones de estas hormonas sobre las células de glía, destacan: el aumento de la recaptura de glutamato de la hendidura sináptica para evitar la excitotoxicidad mediante la sobreexpresión de GLT-1 y GLAST (Gamboa and Ortega 2002; Lee et al. 2009), la disminución de la oxidación (Astiz et al. 2014; Genis et al. 2014), la disminución de la producción de citoquinas proinflamatorias (Kipp et al. 2007; Lewis et al. 2008; Bellini et al. 2011), la disminución del edema mediante la regulación de acuaporina 4 (O'Donnell et al. 2006) y la inducción de la liberación de otros factores neurotróficos (Sortino et al. 2004; Platania et al. 2005).

Los mecanismos moleculares implicados en estas funciones se han estudiado ampliamente, pero todavía no se conocen en detalle todas las moléculas que las median. Por ejemplo, se sabe que en astrocitos *in vitro* el ER β es el encargado de mediar los efectos antiinflamatorios del estradiol (De Marinis et al. 2010; Astiz et al. 2014); mientras que en un modelo *in vivo* de esclerosis múltiple el ER α de los astrocitos es el responsable de los efectos neuroprotectores del esteroide (Spence et al. 2011). Por otra parte, se sabe que el 17 β -estradiol, los SERMs y el IGF-1 son capaces de disminuir la síntesis de citoquinas proinflamatorias en astrocitos mediante la inhibición de la translocación del factor nuclear- κ B (NF- κ B) al núcleo (Fernandez et al. 2007; Cerciati et al. 2010; Giraud et al. 2010; Bellini et al. 2011). En los astrocitos, estos efectos antiinflamatorios son dependientes de la proteína neuroprotectora neuroglobina, en el caso del estradiol (De Marinis, Acaz-Fonseca, et al. 2013), y de calcineurina en el caso del IGF-1 (Fernandez et al. 2007).

3. LA RUTA DE SEÑALIZACIÓN DE NOTCH

3.1. Mecanismos de señalización de Notch y su regulación

La aparición de los organismos multicelulares fue uno de los eventos más importantes de la evolución, ya que permitió nuevas y complejas formas de organización en la naturaleza. Dado que un organismo no sólo es un grupo de células, alcanzar dicho grado de complejidad en las estructuras biológicas requirió el desarrollo de sistemas sofisticados de comunicación intercelular. Las interacciones célula a célula mediante rutas de señalización son, por lo tanto, cruciales para el desarrollo y la evolución de los organismos multicelulares (Gazave et al. 2009).

Entre dichas rutas de señalización célula a célula destaca la ruta de Notch, que está altamente conservada a lo largo de la filogenia. En mamíferos, la ruta de Notch está formada por cuatro receptores (Notch 1-4), sus ligandos Delta-like (Dll) (1, 3 y 4) y Jagged (Jag) (1 y 2), factores de transcripción (CBF1) y reguladores positivos y negativos (Allenspach et al. 2002).

Los receptores Notch son proteínas grandes (300 kDa) de un solo paso transmembrana. Tras su síntesis, el receptor es cortado en el aparato de Golgi por una endoproteasa tipo furina. Dicha escisión ocurre en su dominio extracelular yuxtamembrana (conocido como sitio 1, o S1), y genera dos fragmentos de 120 y 180 kDa. Estos fragmentos permanecen asociados formando un heterodímero que alcanza la membrana plasmática. Allí, el receptor puede ser activado cuando su dominio extracelular interactúa con el dominio extracelular de uno de sus ligandos (Dll o Jag), expresados en la membrana plasmática de una célula contigua. La unión del ligando genera un cambio conformacional que favorece la escisión en el sitio 2 (S2) del receptor, cerca de la superficie de la membrana celular, y llevada a cabo por las metaloproteasas ADAM 17/TACE o ADAM 10/kuzbanian.

El fragmento extracelular truncado de Notch (NEXT) resultante es cortado posteriormente por el complejo enzimático γ -secretasa en su dominio intermembrana (sitios 3 y 4, S3 y S4). Esto libera al fragmento intracelular de Notch (NICD), su fragmento activo. NICD se transloca al núcleo, donde se asocia a la proteína de unión a ADN CBF1 (*C promoter binding factor*) y a sus coactivadores (Mastermind, PCAF/GCN5, CBP, EP300), para promover la transcripción de sus principales genes diana: *hairy and enhancer of split* (HES), y *HES-related YRPW motif* (HEY). CBF1 (también conocido como RBPJk, *recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa J region*) es un factor de transcripción que se une a los promotores sensibles a Notch. Cuando la ruta de Notch no está activa, CBF1 permanece unido a sus correpresores (SMRT, N-coR, SPEN) y la transcripción queda inhibida; pero en presencia de NICD, éste desplaza a los correpresores y se une a CBF1 (junto con sus coactivadores), facilitando la transcripción génica. Para finalizar la señalización, NICD es fosforilado y ubiquitinado para ser degradado por el proteasoma (Fiúza and Arias 2007; D'Souza et al. 2008; Kopan and Ilagan 2009; Arzate-Mejía et al. 2011; Borggrefe and Liefke 2012) (Figura 2).

Esta forma de activación de la ruta de Notch mediante la unión de ligandos expuestos en la célula contigua se considera la vía canónica, y también se conoce como activación en *trans*.

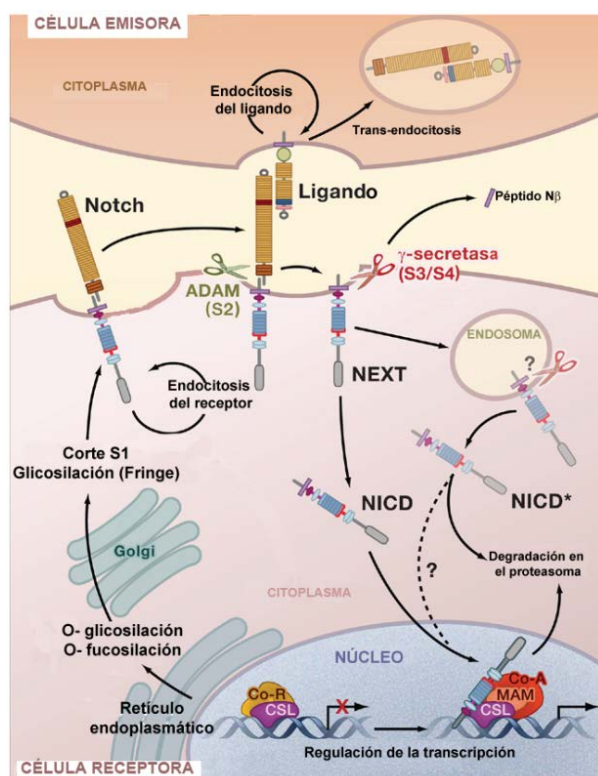


Figura 2. Activación canónica de la ruta de Notch. Tomada de (Kopan and Ilagan 2009).

A pesar de su aparente sencillez, la ruta canónica de Notch está modulada por varios factores. En primer lugar la diversidad de receptores y ligandos, puede provocar interacciones que conduzcan tanto a la activación como a la inhibición de la ruta. Además, la intensidad de la señal de Notch está regulada por microARNs y por modificaciones post-traduccionales del receptor o sus ligandos (glicosilación, fucosilación y ubiquitinización) (Ladi et al. 2005; Fiúza and Arias 2007; Stanley and Okajima 2010; Wang et al. 2010; Le Bras et al. 2011; Petrovic et al. 2014).

Otra posible interacción entre Notch y sus ligandos ocurre cuando ambos se expresan en la misma célula, en *cis*. La unión de sus dominios extracelulares impide que el receptor pueda señalizar mediante su NICD, y también impide que el ligando quede disponible para señalizar en *trans* (a una célula vecina); por lo que la señalización en *cis* es inhibitoria (Sprinzak et al. 2010; Del Álamo et al. 2011; Fleming et al. 2013).

Además, la ruta de Notch puede ser regulada de forma no canónica; sus genes diana pueden ser transcritos mediante la regulación del receptor Notch independientemente de ligando, o sin que tenga que intervenir CBF1. Estos efectos no

canónicos implican la interacción entre Notch y otras rutas de señalización intracelular, como Sonic-Hedgehog, Wnt/ β -catenina, BMP/TGF- β , JAK/STAT, JNK, Ras, NF- κ B y HIF (Kamakura et al. 2004; Gustafsson et al. 2005; Stockhausen et al. 2005; Curry et al. 2006; Diez et al. 2007; Osipo et al. 2008; Sanalkumar et al. 2010; Johnson 2011; Andersen et al. 2012; Poser et al. 2013). No se conocen en detalle los mecanismos que median todas estas interacciones, aunque se sabe que algunas rutas de señalización son capaces de regular el tráfico intracelular de Notch, sus modificaciones post-traduccionales, su endocitosis o la estabilidad del NICD (Schweisguth 2004; Hori et al. 2012).

En muchos tipos celulares se ha demostrado que el estradiol es capaz de modular la actividad de la ruta de Notch (Soares et al. 2004; Sobrino et al. 2009; Nakamura et al. 2012; Caliceti et al. 2013), incluso en neuronas de hipocampo (Bender et al. 2010; Ruiz-Palmero et al. 2011). A pesar de que los mecanismos de comunicación entre ambas rutas son desconocidos, podrían darse interacciones a nivel transcripcional (Hao et al. 2010).

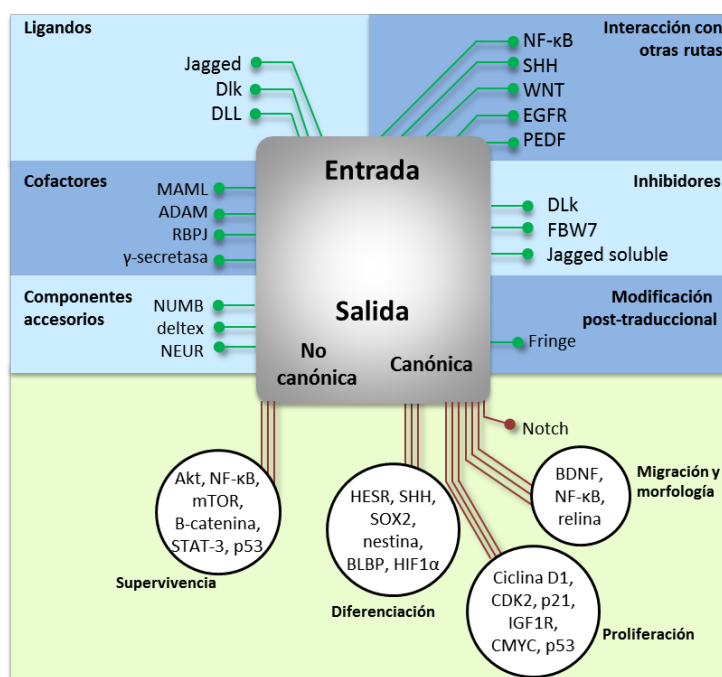


Figura 3. Integración de señales por parte de la ruta de Notch y coordinación de una respuesta dependiente del contexto celular. Tomada de (Ables et al. 2011).

Como se ilustra en la Figura 3, la ruta de Notch puede considerarse como un centro de integración de múltiples rutas de señalización; dando lugar a respuestas muy

variadas, y variables dependiendo del contexto celular y molecular. Esto nos ayuda a comprender la gran cantidad de funciones que desempeña la ruta de Notch.

3.2. Funciones de la ruta de Notch en el Sistema Nervioso

La activación de Notch conduce a la transcripción de las familias génicas HES y HEY. Ambas pertenecen a la superfamilia de los genes bHLH (*basic helix-loop-helix*), y reprimen la transcripción de genes proneurales como las Neurogeninas (Ngn), Mash y NeuroD (Iso et al. 2001; Lundkvist and Lendahl 2001).

La familia HES está dividida en cuatro subfamilias, con varios miembros cada una en vertebrados. En el SNC de ratón Notch controla la expresión de Hes-1 (subfamilia *hairy*) y Hes-5 (subfamilia E(spl)) (Davis and Turner 2001), regulando funciones clave durante el desarrollo embrionario como la neurulación, la proliferación y diferenciación de progenitores neurales (lo que implica el control de neurogénesis y gliogénesis), la neuritogénesis y el desarrollo de los órganos sensoriales (Hojo et al. 2000; Kageyama et al. 2005; Fischer and Gessler 2007; Arevalo et al. 2011). En el cerebro adulto, Notch participa en la memoria a largo plazo (Costa et al. 2003), en la regulación de la morfología del árbol dendrítico (Breunig et al. 2007), en la plasticidad sináptica (Dahlhaus et al. 2008) y en la neurogénesis postnatal (Lugert et al. 2010).

A pesar de que las funciones de Notch en las células gliales del SNC adulto no se han explorado demasiado, sí parece claro que la ruta de Notch interviene en la neuroinflamación. Por ejemplo, se ha descrito que Notch regula la activación de la microglía y la producción de citoquinas proinflamatorias mediante su interacción con NF- κ B (Grandbarbe et al. 2007; Cao et al. 2010, 2011; Wei et al. 2011; Yao et al. 2013). También se ha demostrado que los astrocitos hipertróficos sobreexpresan Jag-1 *in vivo* (John et al. 2002), y que los filamentos intermedios GFAP y vimentina regulan la actividad de la ruta de Notch en astrocitos *in vitro* (Wilhelmsson et al. 2012).

4. JUSTIFICACIÓN DE LOS OBJETIVOS DE LA TESIS

Se postula que las diferencias sexuales en la respuesta glial pueden participar en la generación de diferencias en el daño causado por las enfermedades neurodegenerativas. No obstante, no se ha estudiado demasiado cómo reaccionan las células gliales de machos y hembras ante estímulos neuroinflamatorios *in vivo*. Por ese motivo, la primera parte de este estudio consiste en estudiar la respuesta de astrocitos y microglía de ambos sexos en un modelo de lesión cortical penetrante, y analizar sus efectos sobre la supervivencia neuronal. Entre todos los abordajes experimentales que pueden utilizarse para estudiar la neuroinflamación, la lesión penetrante es especialmente adecuada para estudiar en detalle las respuestas multicelulares que se suceden de manera ordenada en el espacio y el tiempo y que conforman el proceso inflamatorio (Hampton et al. 2004). Además, en este tipo de lesiones se ha demostrado la capacidad de los esteroides sexuales para regular la respuesta glial (García-Estrada et al. 1993; López Rodríguez et al. 2011).

En un estudio *in vivo* las diferencias sexuales observadas en la respuesta de las células gliales pueden ser autónomas o depender de otros tipos celulares, mientras que los estudios *in vitro* pueden ayudar a discriminar entre ambos tipos de efecto y además permiten estudiar las respuestas moleculares en detalle. Por ello, en la segunda parte de este trabajo se escogen los cultivos primarios de astrocitos estimulados con lipopolisacárido bacteriano (LPS) como modelo de neuroinflamación *in vitro*. Dado que la ruta de señalización de Notch interviene en la neuroinflamación y que se ha demostrado su regulación por parte del estradiol en neuronas hipocámpales (Ruiz-Palmero et al. 2011), consideramos oportuno investigar la implicación de esta ruta en la astrogliosis, así como su posible aportación a las diferencias sexuales en la respuesta inflamatoria de los astrocitos. Además, ya que el estradiol, los SERMs, la progesterona y el IGF-1 han demostrado propiedades antiinflamatorias en los astrocitos *in vitro* estimulados con LPS (Kipp et al. 2007; Cerciati et al. 2010; Bellini et al. 2011; Santos-Galindo et al. 2011; Astiz et al. 2014), quisimos determinar si la ruta de Notch era mediadora de esa función.

OBJETIVOS



1. Estudiar las posibles diferencias sexuales en la respuesta glial ante una lesión cortical penetrante en ratón, caracterizando a nivel molecular el fenotipo de las células de glía en torno a la lesión.
2. Analizar las diferencias sexuales en la respuesta inflamatoria de los astrocitos *in vitro*.
3. Estudiar la implicación de la ruta de señalización de Notch en la neuroinflamación, su regulación y las funciones que media en astrocitos corticales e hipotalámicos.
4. Determinar si la ruta de señalización de Notch media alguno de los efectos antiinflamatorios del 17β -estradiol, los SERMs, la progesterona o el IGF-1.
5. Explorar las interacciones entre la ruta de Notch y el IGF-1 en condiciones fisiológicas e inflamatorias.

MATERIALES Y MÉTODOS



MODELOS ANIMALES

Los animales fueron criados en ciclos de luz-oscuridad de 12 horas y recibieron agua y comida *ad libitum*. El cuidado y manipulación de los animales se ajustó en todo momento a las directivas de la Unión Europea (86/609/EEC; 2010/63/UE) y a la Legislación Española (BOE 250; 18-10-1989 y BOE 256; 25-10-1990). Todos los diseños experimentales fueron aprobados por el Comité Institucional de uso y cuidado de animales (Subcomité de Bioética del CSIC). Se tuvo especial cuidado para minimizar el sufrimiento del animal y para reducir el número de animales empleados al mínimo necesario.

1. LESIÓN CEREBRAL PENETRANTE

Se usaron ratones CD1 de 8 semanas de edad (adultos jóvenes) y de ambos sexos. Todas las hembras incluidas en el análisis de datos se encontraban en la misma fase del ciclo estral (en fase de estro) para evitar la posible variabilidad causada por las fluctuaciones hormonales del ciclo.

Los animales se anestesiaron con isoflurano y fueron colocados en el estereotáxico (David Kopf Instruments); a continuación se les administró una dosis de analgésico intraperitoneal (0,7 mg/Kg de Buprex, Schering Plough) para disminuir el dolor postquirúrgico. Una vez expuesto, el cráneo se perforó unilateralmente con un taladro y se realizó una incisión sagital a lo largo de la corteza cerebral y del cuerpo calloso, 1 mm lateral respecto de la línea media y desde -1,3 mm hasta -2,5 mm posteriores a bregma con una profundidad de 3 mm desde la superficie cerebral. Las coordenadas se escogieron a partir del atlas de (Paxinos and Franklin 2004).

Una semana después de la lesión los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico (50 mg/kg) y a continuación fueron perfundidos a través del ventrículo izquierdo; primero con suero fisiológico (NaCl 0,9%) y después con paraformaldehído al 4% en tampón fosfato 0,1 M (pH 7,4). Los cerebros fueron post-fijados durante 5 horas a 4°C en la misma solución y finalmente lavados con tampón fosfato 0,1 M (pH 7,4). Se cortaron en un Vibratomo (VT 1000 S, Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) obteniéndose secciones coronales de 50 µm.

En otro grupo de animales, se evaluó el efecto de la lesión sobre la expresión de los genes de la ruta de Notch. Para ello, los animales (todos de sexo masculino) fueron sacrificados mediante dislocación cervical siete días después de la lesión penetrante. Se les extrajo el cerebro rápidamente y se resecionó la porción de tejido en torno a la lesión cortical, así como una porción similar del hemisferio contralateral. El tejido cerebral se congeló inmediatamente en hielo seco, y posteriormente se extrajo el ARN para analizarlo mediante RT-qPCR (tal y como se describe en el punto 10).

2. INMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ)

Las inmunohistoquímicas se realizaron siempre a partir de secciones de 50 µm de tejido cerebral fijado y en flotación. Las secciones histológicas fueron seleccionadas de tal modo que mostraran una lesión completa, para aportar mayor homogeneidad.

2.1. IHQ simple (revelada con DAB)

Todos los lavados e incubaciones fueron realizados en agitación moderada, utilizando una solución de lavado compuesta por tampón fosfato 0,1 M pH 7,4 con 0,3% de Tritón X-100 y 0,3% de albúmina de suero bovino (BSA). Este tampón también se utilizó para diluir los anticuerpos.

Una vez lavadas, las secciones se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente en una solución del 3% de peróxido de hidrógeno en metanol al 30% para inhibir la actividad peroxidasa endógena. Tras lavarlas profusamente, las secciones se incubaron durante una noche a 4°C con el anticuerpo primario (Tabla 4) diluido en solución de lavado con un 5% de suero normal de cabra (Gibco). A continuación, las secciones fueron lavadas durante 10 minutos e incubadas durante 2 h a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario contra inmunoglobulinas G (de conejo o ratón, según correspondiera) generado en cabra y conjugado con biotina. Una vez lavados los cortes fueron incubados durante 90 minutos a temperatura ambiente con un complejo avidina-biotina-peroxidasa (diluido 1:250; ImmunoPure ABC peroxidase staining kit, Pierce). El producto de la reacción fue revelado con 2 µg/ml de 3,3'-diaminobenzidina (DAB; Sigma-Aldrich, Tres Cantos, España) y 0,01% de H₂O₂ en tampón fosfato 0,1 M. A continuación, las secciones fueron montadas en portaobjetos gelatinizados,

deshidratadas, cubiertas con DEPEX (BDH Laboratory Supplies, Inglaterra) y observadas con un microscopio Leica DMRB-E.

2.2. IHQ de fluorescencia

Todos los lavados e incubaciones se realizaron con las secciones cerebrales en agitación suave, empleando la misma solución de lavado que en la sección 2.1 (excepto que se especifique lo contrario).

Tras varios lavados, los cortes cerebrales fueron incubados con el anticuerpo primario (o con la mezcla de anticuerpos primarios en el caso de las dobles IHQ) (Tabla 4) a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente las secciones se volvieron a lavar varias veces a temperatura ambiente y durante 2 h se incubaron los anticuerpos secundarios acoplados a fluoróforo. Para cada combinación de anticuerpos siempre se tuvo en cuenta la especie animal en la que fueron generados, así como los espectros de excitación y emisión de los fluoróforos acoplados a los anticuerpos secundarios.

Las secciones se montaron en porta-objetos gelatinizados, se dejaron secar a temperatura ambiente, se cubrieron usando Vectashield-DAPI (Vector Laboratories) y se sellaron con laca de uñas. Las preparaciones fueron estudiadas con un microscopio confocal Leica SP5 acoplado a una cámara Leica DFC350 FX.

Antígeno	Especie hospedadora	Dilución	Casa comercial
GFAP	Conejo	1/2000	Dako
Arg-1	Conejo	1/200	Santa Cruz
CD16/32	Conejo	1/200	BD Pharmingen
GFAP	Ratón	1/750	Sigma Aldrich
Iba1	Conejo	1/2000	Wako
MCP-1 (CCL2)	Conejo	1/200	Torrey Pines Biolabs
NeuN	Ratón	1/800	Millipore
Neuroglobina (13C8)	Ratón	1/1000	Abcam
Vimentina	Conejo	1/1000	Dako
β III- tubulina (clon 5G8)	Ratón	1/1000	Promega

Tabla 4. Anticuerpos primarios usados para inmunohistoquímica (DAB y fluorescencia)

3. ANÁLISIS MORFOMÉTRICO

En las preparaciones obtenidas de la inmunohistoquímica sencilla se llevó a cabo un estudio de recuento celular ciego, empleando la técnica del disector óptico (Howard and Reed 1998; Hatton and von Bartheld 1999). Se contó el número total de células teñidas que había en un área de 220 μm x 220 μm , teniendo en cuenta el grosor total de cada sección histológica y usando el objetivo de 40x. De este modo se estimó el número de células por unidad de volumen marcadas con GFAP, vimentina, Iba1, β III-tubulina y NeuN en las capas V y VI de la corteza cerebral.

Además, las células inmunorreactivas para Iba1 (microglía) fueron clasificadas morfológicamente en seis categorías (clasificación basada en la que se describe en (Diz-Chaves et al. 2012)): tipo I, células con dos o menos prolongaciones; tipo II, células con entre 3 y 5 ramificaciones cortas; tipo III, células con más de 5 procesos largos y cuerpo celular pequeño; tipo IV, cuerpo celular más grueso y proyecciones retraídas y gruesas; tipo V, morfología ameboidea con marcaje muy intenso y muchas ramificaciones muy cortas; y tipo VI, células con marcaje muy intenso y forma de bastón. Los fenotipos microgliales I, II y III se consideraron como células no reactivas, mientras que los tipos IV, V y VI como microglía reactiva (Figura 4). En cada sección se contaron al menos 100 células y se calculó el porcentaje de cada categoría fenotípica.

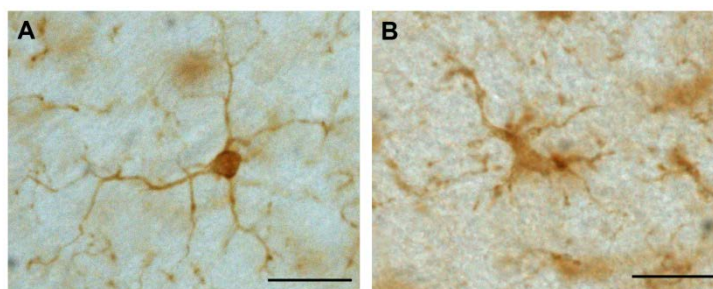


Figura 4. Clasificación morfológica de las células inmunopositivas para Iba1, en fenotipo no reactivo (A) y fenotipo reactivo (B). La barra de escala representa 50 μm .

4. CULTIVOS PRIMARIOS DE GLÍA ENRIQUECIDOS EN ASTROCITOS

Los cultivos primarios se obtuvieron a partir de ratones CD1 de entre 0 y 2 días de vida postnatal (P0-P2), manteniendo siempre por separado los machos de las hembras. Se usó la distancia ano-genital como criterio para distinguir el sexo de los animales.

Tras la disección del hipotálamo y la corteza cerebral de cada animal, se retiraron completamente las meninges con el fin de evitar contaminaciones con otros tipos celulares. Dichas áreas cerebrales se trituraron mecánicamente hasta obtener fragmentos de aproximadamente 1 mm^3 en HBSS (*Hank's Balanced Salt Solution*, Sigma). Tras ser lavados varias veces, se homogeneizaron completamente en DMEM-F12 (*Dubelco's modified Eagle's medium* y suplemento F12 en proporción 1:1, Sigma) usando una pipeta Pasteur de vidrio. Dicho homogeneizado se filtró a través de una red de nailon con poros de $40\text{ }\mu\text{m}$ (BD Biosciences) para obtener una suspensión de células individualizadas. La suspensión celular se sembró en botellas de 75 cm^2 usando DMEM-F12 con rojo fenol (suplementado con un 10% de suero fetal bovino y con 1% de antibiótico/antimicótico). Pasados 7 días *in vitro* (DIV) a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ y con un 5% de CO_2 , las botellas se colocaron durante una noche en un agitador orbital (Thermo Forma, Marietta, OH, USA), después se tripsinizaron las células y se sembraron en nuevas botellas. Tras este primer pase las células crecieron en DMEM-F12 (con aditivos pero sin rojo fenol), y se mantuvieron en el incubador hasta alcanzar entre un 90 y un 100% de confluencia. En ese momento se repitió el proceso de agitación y tripsinización y las células se sembraron de manera adecuada a cada experimento (Figura 5). Durante todo este proceso el medio de cultivo se cambió dos veces por semana. Con este protocolo se obtuvieron cultivos de glía cortical e hipotalámica enriquecidos en astrocitos (menos del 5% de células Iba-1 positivas).

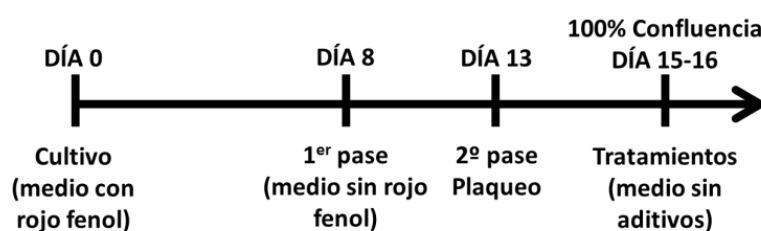


Figura 5. Resumen temporal del protocolo para los cultivos primarios de células gliales.

5. TRATAMIENTOS CELULARES

Para los análisis bioquímicos las células fueron sembradas en placas de 6 pocillos en DMEM-F12 con un 10% de suero y un 1% de antibiótico/antimicótico. Una vez que las células alcanzaron el 100% de confluencia en los pocillos, se lavaron con PBS y se les administraron los tratamientos correspondientes en DMEM-F12 sin rojo fenol y sin aditivos, tal y como se detalla en la Tabla 5.

Tratamiento	Función	Concentración	Tiempo	Casa comercial
LPS	Agonista TLR4	500 ng/mL	5 h, 14 h, 24 h, 48 h	Sigma Aldrich
17β-estradiol	Agonista ERs	0,1 nM	5 h, 14 h, 24 h, 48 h	Sigma Aldrich
Letrozol	Inhibidor aromatasa	100 nM	4 h + 24 h	Novartis
Tamoxifeno	SERM	10 nM	24 h	Sigma Aldrich
Raloxifeno	SERM	10 nM	24 h	Sigma Aldrich
Ospemifeno	SERM	1 nM	24 h	Sigma Aldrich
Bazedoxifeno	SERM	1 nM	24 h	Sigma Aldrich
Progesterona	Agonista PRs	0,1 y 10 nM	24 h	Sigma Aldrich
IGF-1	Agonista IGF1R	100 nM	5 min, 15 min, 24 h	ProSpec-Tany
DAPT	Inhibidor γ-secretasa	2,5 μM	4 h + 24 h	Calbiochem
NVP	Antagonista IGF1R	400 nM	4 h + 24 h	Cayman Chemical
Wortmanina	Inhibidor PI3K	100 nM	2 h + 24 h	Calbiochem
U0126	Inhibidor MEK	10 μM	2 h + 24 h	Cell Signaling
BAY-11	Inhibidor NF-κB	10 μM	4 h + 24 h	Calbiochem

Tabla 5. Tratamientos aplicados a los cultivos celulares. Todos los inhibidores se administraron como un pretratamiento de 2 o 4 h, y posteriormente se mantuvieron durante el resto del tratamiento (en presencia o ausencia del correspondiente agonista).

6. VIABILIDAD CELULAR

Para evaluar un posible efecto citotóxico del LPS los astrocitos fueron sometidos a un ensayo de MTS (*CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay*, Promega). Los astrocitos corticales fueron sembrados en placas de 96 pocillos y se les aplicó un tratamiento con concentraciones crecientes del LPS durante 24 h. Tres horas antes de finalizar el tratamiento se añadió el MTS al medio de cultivo, según las instrucciones de uso del fabricante. Al finalizar el tratamiento se leyó la absorbancia a 450 nm en un lector de placas de ELISA. Cada punto de la curva se midió por triplicado, y el experimento se repitió tres veces.

El número de células en cada pocillo correlaciona con la capacidad de reducir el MTS a un producto coloreado y soluble. El MTS es reducido principalmente por la actividad enzimática mitocondrial presente básicamente en las células vivas.

7. TRANSFECCIÓN

Los astrocitos fueron transfectados con un plásmido cedido por JS Nye que expresa el fragmento intracelular de Notch (NICD) y un epítipo de *c-myc* que se empleó como etiqueta (Nye et al. 1994); el plásmido control sólo incluye la secuencia del epítipo de *myc*.

Los cultivos fueron transfectados al alcanzar un 60-70% de confluencia con el kit Effectene Transfection Reagent (Qiagen GmbH, Hilden, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante. Primero se crearon los complejos ADN-Effectene en medio de cultivo (DMEM-F12 sin aditivos), formándose unas estructuras micelares que se añadieron a las células durante 3 horas a 37°C y 5% CO₂. Posteriormente se lavaron las células con DMEM-F12 (suplementado con 10% de suero) y se dejaron crecer durante 24 h para permitir la expresión proteica y que se alcanzara el 100% de confluencia. Tras ser tratados con LPS, los cultivos fueron procesados tanto para el estudio de la transcripción génica (apartado 10) como para su análisis morfológico (mediante inmunocitoquímica, apartado 14).

8. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE RT-qPCR

Para analizar los cambios en la expresión de los genes de interés provocados por los distintos tratamientos seguimos los siguientes pasos. En primer lugar se extrajo el ARN total de las células en cultivo utilizando el kit Illustra RNAspin Mini RNA isolation de GE Healthcare (Buckinghamshire, Reino Unido). A continuación se preparó el ADN copia (ADNc) a partir de 3 µg de ARN, usando la enzima transcriptasa inversa M-MLV (Promega, EEUU) según las indicaciones del fabricante. Finalmente se llevó a cabo la amplificación del ADNc mediante PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR) (ABI Prism 7500 Sequence Detection System, Applied Biosystems) con el programa de ciclos

recomendados por el fabricante (40 ciclos: 15 segundos a 95 °C seguidos de 1 minuto a 60 °C).

La enzima polimerasa empleada fue la presente en *TaqMan Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems) para Hes-5 y Ngn-3 (*TaqMan Gene expression assay*, Applied Biosystems) y *SYBR Green Master Mix* para el resto de genes, cuyos cebadores (Tabla 6) fueron diseñados mediante el programa Primer Express 3.0 de Applied Biosystems y sintetizados por Invitrogen.

	Forward 5´- 3´	Reverse 5´- 3´
ARNr 18S	CGCCGCTAGAGGTGAAATTCT	CATTCTTGGCAAATGCTTTTCG
Cx-43	GCCCGAACTCTCCTTTTCCT	TGTCTGGGCACCTCTCTTTCA
DIk-1	AATGTCTGCAGGTGCCATGTT	TGCACTGCCATGGTTCCTT
GFAP	GGTCCGCTTCCTGGAACA	GCTCCGCTGGTAGACATCA
Hes-1	CCAGCCAGTGTCAACACGA	AATGCCGGGAGCTATCTTTCT
HIF-1α	GGCGAAGCAAAGAGTCTGAAGT	GAGCCTCATAACAGAAGCTTTATCAA
IL-6	GAAACCGCTATGAAGTTCCTCTCTG	TGTTGGGAGTGGTATCCTCTGTGA
IP-10	CAGGAGAATGAGGGCCATAGG	CGGATTCAGACATCTCTGCTCAT
Jag-1	TCAGGACACACAACCTCGGAAGT	CTCCTCTCTGTCTACCAGCGTATACA
NeuroD D	CTGCGAGATCCCCATAGACAAC	CCTCTAATCGTGAAAGATGGCATT
Notch-1	CCCTTGCTCTGCCTAACGC	GGAGTCCTGGCATCGTTGG
TNF-α	GAAAAGCAAGCAGGCAACCA	CGGATCATGCTTTCTGTGCTC
Vimentina	GCTGCAGGCCCAGATTCA	TTCATACTGCTGGCGCACAT

Tabla 6. Cebadores específicos diseñados, validados y empleados en el análisis de ARNm mediante RT-qPCR.

El análisis de los datos de la PCR cuantitativa se llevó a cabo por el método del $\Delta\Delta Ct$ (User Bulletin 2 P/N 4303859B, Applied Biosystems); los cebadores diseñados se validaron mediante curvas estándar, de tal modo que se demostrara que la eficiencia de amplificación de cada pareja de cebadores fuera la misma que la del control endógeno (ARNr 18S).

9. WESTERN BLOT

Las células fueron lisadas en 150 µL de tampón Laemmli (Tris-HCl 25 mM pH 6.8, con 2% de SDS, 10% de glicerol, DTT 100 mM y azul de bromofenol), sonicadas y hervidas durante 5 minutos. Las proteínas solubilizadas (20 µL) se resolvieron en geles de acrilamida/bis-acrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE 8-10%), a 100

V durante 1 h a temperatura ambiente. A continuación se transfirieron a membranas de nitrocelulosa de 0,2 μ m de poro (Trans-Blot Turbo Transfer Pack, Biorad), con 1,3 A durante 10 minutos en un sistema semiseco (Trans-Blot Turbo Transfer System, Biorad). Las membranas se bloquearon con albúmina de suero bovino al 5% (p/v) en TTBS (NaCl 138 mM, Tris-HCl 25 mM a pH 8.0 y 0.1% (p/v) de Tween-20) durante 2 horas. Posteriormente se incubaron toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario diluido en la misma solución de bloqueo. Tras varios lavados en TTBS se incubaron con el correspondiente anticuerpo secundario generado en cabra y conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) durante 2 h a temperatura ambiente (diluido 1:10000 en TTBS, Jackson Laboratories). Todos los anticuerpos primarios empleados se detallan en la Tabla 7.

Antígeno	Especie hospedadora	Dilución	Casa comercial	Peso Molecular
Akt 1/2/3	Conejo	1:1000	Cell Signaling	60 kDa
Cleaved Notch-1 (Val1744)	Conejo	1:500	Cell Signaling	110 kDa
ERK 1/2	Conejo	1:1000	Cell Signaling	42 y 44 kDa
GFAP	Ratón	1:5000	Sigma	50 kDa
IGF1R beta	Conejo	1:500	Santa Cruz	90 kDa
IGF1R, 25%ag	Ratón	20 μ g/mL	Santa Cruz	IP
pAkt (Ser473)	Conejo	1:1000	Cell Signaling	60 kDa
pERK 1/2 (Thr202/Tyr204)	Conejo	1:5000	Cell Signaling	42 y 44 kDa
pTyr (PY20)	Ratón	1:200	Santa Cruz	IP
β -Actina (AC-74)	Ratón	1:4500	Sigma	42 kDa

Tabla 7. Anticuerpos primarios empleados para el análisis de la expresión proteica mediante Western Blot, así como para la inmunoprecipitación.

El revelado se realizó con ECL (Amersham), que produce quimioluminiscencia. La densitometría y cuantificación de las bandas en las películas fotográficas se llevó a cabo con el programa Quantity One de BioRad; los datos de cada proteína fueron normalizados al control de carga (β -actina) y se representan como porcentaje del grupo control.

10. INMUNOPRECIPITACIÓN DEL RECEPTOR DE IGF-1

Con el objeto de analizar el grado de fosforilación y activación del IGF1R se procedió a purificarlo mediante inmunoprecipitación. Los astrocitos fueron estimulados con IGF-1 durante 5 minutos, finalizando con un lavado con PBS frío para detener la fosforilación. A continuación se lisaron las células en un tampón para extracción de proteínas (PEB: NaCl 150 mM, Tris HCl 10 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, Triton X-100 1 % y NP-40 0,5%) con inhibidores de proteasas y fosfatasas. Los lisados celulares fueron incubados con un anticuerpo primario contra el IGF1R conjugado con agarosa (Tabla 4) durante toda la noche a 4°C y en agitación. A la mañana siguiente los inmunocomplejos se precipitaron mediante centrifugación (1 minuto a 3000 rpm y 4 °C), se aspiró el sobrenadante y resuspendió el precipitado en 1 mL de PEB frío. Este lavado se repitió dos veces más; finalmente el precipitado se resuspendió en 30 µL de tampón Laemmli, se hirvió y centrifugó. Los sobrenadantes fueron procesados mediante Western Blot, según el protocolo detallado en el apartado 11 de este capítulo. En primer lugar se estudió el grado de fosforilación del IGF1R con un anticuerpo que reconoce específicamente los residuos de tirosina fosforilados (anti-pTyr, Tabla 7). Tras un proceso de *stripping* (ReBlot Plus Mild, Biorad) se midió la cantidad total del receptor (anti-IGF1R β, Tabla 7), que se usó como control de carga.

11. ANÁLISIS DEL CICLO CELULAR MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO

Los astrocitos fueron sembrados a una densidad de 40.000 células/cm² en DMEM-F12 con aditivos; 24 h después se lavaron con PBS y se aplicaron los tratamientos en DMEM-F12 sin aditivos. Los cultivos de astrocitos fueron tratados durante 24 horas con IGF-1 y DAPT (inhibidor de γ-secretasa) de manera individual o combinada, en presencia del análogo de timidina 5-bromo-2-desoxiuridina (BrdU, 10 µM). A continuación, las células fueron recogidas mediante tripsinización y se fijaron con etanol al 70%. Las muestras se sometieron a un tratamiento ácido (HCl 2N, durante 30 minutos) para abrir los epítomos de la BrdU, que fue neutralizado con tetraborato de sodio. Las muestras se incubaron durante 1 h con un anticuerpo primario contra BrdU (Hybridoma Bank) hecho en ratón y con el correspondiente anticuerpo secundario contra IgG de ratón acoplado al fluoróforo Alexa 647 (Invitrogen). Ambos anticuerpos se

usaron a una dilución 1:20 en PBS con 1% de BSA y 0,5% de Tween-20. Tras un lavado, las células fueron transferidas a tubos de poliestireno aptos para citometría, en los que se añadieron la ARNasa A (100 µg/mL) y el ioduro de propidio (50 µg/mL).

Para el análisis del ciclo celular se usó un citómetro de flujo FACS Aria (BD Biosciences, San Diego, CA), equipado con un láser doble de argón (488 nm) y helio-neón (633 nm). Los filtros de emisión empleados fueron BP 616/23 para el ioduro de propidio y BP 660/20 para el Alexa 647. Los restos celulares y los dobletes de células se excluyeron del análisis, y se adquirieron un mínimo de 10.000 eventos en cada experimento.

12. INMUNOCITOQUÍMICA

Para los estudios de morfología y proliferación celular los astrocitos se sembraron en cubreobjetos de 10 mm de diámetro a una densidad de 20.000 células/cm², con DMEM-F12 suplementado. Trascorridas 24 h se retiró el medio, se lavaron las células con PBS a 37 °C y se realizaron los tratamientos correspondientes.

Al finalizar el tratamiento las células fueron fijadas con paraformaldehído 4% en tampón fosfato 0,1 M durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se permeabilizaron con Tritón X-100 (0,12% en PBS/gelatina 0,12%) durante 4 minutos y se lavaron varias veces con PBS/gelatina 0,12%. A continuación los cubreobjetos se incubaron con los correspondientes anticuerpos primarios (Tabla 8) diluidos en PBS/gelatina durante 1 h a temperatura ambiente. Tras varios lavados, se incubaron con los anticuerpos secundarios fluorescentes durante 45 minutos a temperatura ambiente (Tabla 8). Los cubreobjetos se montaron con Vectashield-DAPI (Vector Laboratories, CA, EEUU) y se sellaron con laca de uñas transparente. Las preparaciones fueron analizadas en un microscopio de fluorescencia Leica DMI6000 acoplado a una cámara Leica DFC350 FX.

12.1. Análisis morfológico y pureza del cultivo

Las células inmunopositivas para GFAP (y las dobles positivas c-myc/GFAP en el caso de los cultivos transfectados) se clasificaron en tres categorías morfológicas (Figura 6): poligonales (con citoplasma redondeado, sin prolongaciones), bipolares (células con forma alargada y células con una prolongación prominente, de longitud superior al

tamaño del cuerpo celular) y estrelladas (células con varias prolongaciones finas y largas, y que presentan un marcaje muy intenso con GFAP).

Para evaluar la pureza del cultivo se calculó el porcentaje de células inmunorreactivas para Iba1 (marcador de microglía) con respecto al número total de núcleos (teñidos con DAPI).

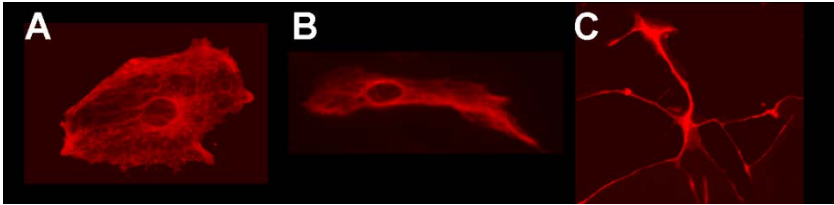


Figura 6. Imágenes representativas de astrocitos *in vitro* marcados con GFAP, con morfología poligonal (A), bipolar (B) y estrellada (C).

12.2. Análisis de la proliferación celular

Para estudiar la proliferación celular se midió la incorporación de BrdU en los núcleos celulares. Los tratamientos se aplicaron junto con un pulso de BrdU 10 μ M en el medio de cultivo. Tras la fijación de las células se realizó un tratamiento ácido con HCl 2N durante 30 minutos a 37°C, que fue neutralizado con borato de sodio 0,1 M pH 8,5 durante otros 30 minutos a 37°C. A partir de ese punto se realizó una inmunocitoquímica doble (siguiendo el mismo protocolo que se describe más arriba) contra GFAP y BrdU.

Antígeno	Especie hospedadora	Dilución	Casa comercial
GFAP (GA5)	Ratón	1:500	Sigma-Aldrich
Anti-mouse Alexa 594	Cabra	1:1000	Jackson Laboratories
Anti-Rabbit Alexa 488	Cabra	1:1000	Jackson Laboratories
BrdU	Ratón	1:2500	Hybridoma Bank
c-myc (9E10)	Ratón	1:500	Roche
GFAP	Conejo	1:500	Dako
Iba1	Conejo	1:500	Wako

Tabla 8. Anticuerpos primarios usados para inmunocitoquímica

13. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los datos de las gráficas están expresados como media \pm error estándar de la media (EEM). Para el análisis estadístico se usó el paquete informático SPSS, versión 21. En primer lugar, se evaluó la normalidad de cada variable mediante el test de

Kolmogórov-Smirnov. En el caso de que alguna de las variables no se distribuyese normalmente, se procedió a transformarla usando su logaritmo natural.

Para estudiar las posibles diferencias entre más de dos grupos experimentales, se emplearon pruebas de análisis de la varianza (ANOVA) de una, dos o tres vías, con su correspondiente prueba *post-hoc* (Bonferroni o Games-Howell en función de que la prueba de Levene determinase que había homocedasticidad o no, respectivamente). Las comparaciones entre las medias de dos grupos experimentales se estudiaron mediante la prueba t de Student. El tamaño muestral de los experimentos se detalla en cada pie de figura.

RESULTADOS



I. DIFERENCIAS SEXUALES EN NEUROINFLAMACIÓN (*IN VIVO*)

Se practicaron lesiones cerebrales penetrantes en ratones adultos de ambos sexos, y se analizó mediante técnicas de inmunohistoquímica la respuesta inflamatoria por parte de las células de glía corticales. Para incluir el efecto de la distancia a la lesión en los análisis, se establecieron cinco regiones consecutivas de 220 μm cada una empezando en el borde de la cicatriz (región 1: 0-220 μm ; región 2: 220-440 μm ; región 3: 440-660 μm ; región 4: 660-880 μm ; región 5: 880-1100 μm).

1. RESPUESTA DE LA MICROGLÍA A LA LESIÓN PENETRANTE

En la Figura 7 A-D se muestran fotografías representativas de las cortezas cerebrales lesionadas de machos y hembras marcados con Iba1. El número total de células inmunopositivas para Iba1 (células Iba1+) aumentó significativamente en la zona cercana a la lesión (0-660 μm) con respecto al hemisferio contralateral, en ambos sexos (Figura 7 E). Dentro del hemisferio lesionado la evaluación del número total de células Iba1+ reveló un efecto global significativo tanto del sexo ($F=5,044$; $P=0,030$) como de la distancia a la lesión ($F=2,874$; $P=0,035$). En los machos se observó una disminución significativa en la densidad de células Iba1+ conforme aumentaba la distancia al borde de la lesión (a partir de la región 4), pero en las hembras no. Además, los machos presentaron un mayor número de células Iba1+ que las hembras en la región más cercana al borde de la lesión (región 1). No se observaron diferencias sexuales en el hemisferio contralateral (Figura 7 E).

Para profundizar en el análisis de la respuesta microglial a la lesión, las células Iba1+ fueron clasificadas en seis categorías de acuerdo con su morfología. A continuación se evaluó la densidad de microglía reactiva (tipos IV-VI) y no reactiva (tipos I-III) en cada una de las cinco regiones (Figuras 7 F y 7 G, respectivamente). La disminución en densidad de células Iba1+ totales conforme aumentaba la distancia a la lesión en machos se debía fundamentalmente a la disminución de células con morfología reactiva ($F=12,295$; $P=0,000$), ya que la densidad de microglía con morfología no reactiva se mantuvo estable a lo largo de toda la zona estudiada ($F=2,226$; $P=0,105$).

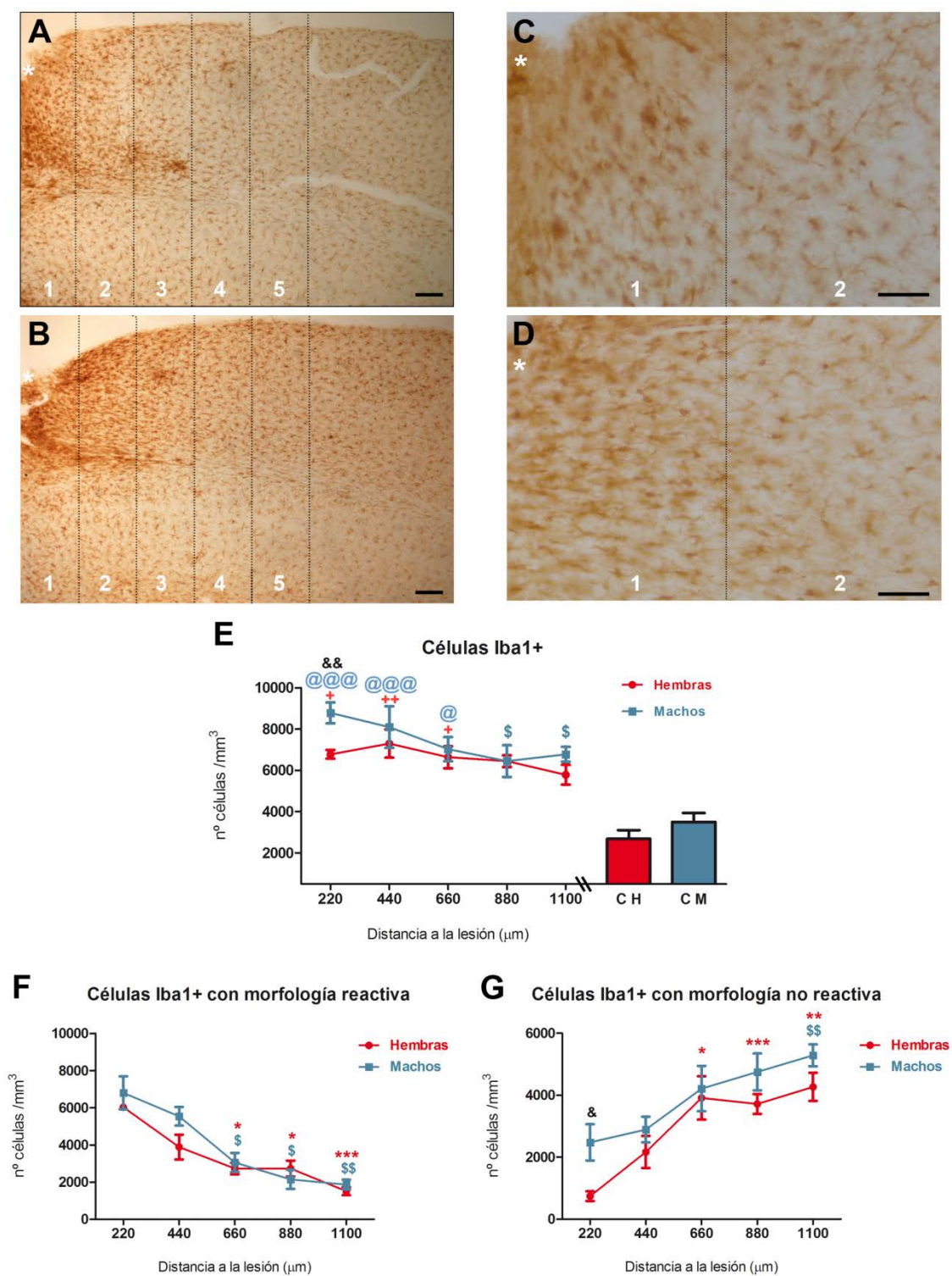


Figura 7. Inmunohistoquímica contra Iba1 en cortezas cerebrales de hembras (A, C) y machos (B, D) lesionados. Las líneas discontinuas delimitan las cinco regiones de estudio con respecto al borde de la lesión (asterisco). Las barras de escala equivalen a 100 μm (A, B) y 50 μm (C, D). Cuantificación de las células inmunopositivas para Iba1 por unidad de volumen en el hemisferio lesionado y en el contralateral de hembras (CH) y machos (CM): totales (E), con morfología reactiva (F) y con morfología no reactiva (G). +, ++ diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$; $P < 0,01$) respecto de CH. @, @@@ diferencias significativas ($P < 0,05$; $P < 0,005$) respecto de CM. *, **, *** diferencias significativas ($P < 0,05$; $P < 0,01$ y $P < 0,005$) respecto de “Hembras 220 μm ”. \$, \$\$\$, diferencias significativas ($P < 0,05$ y $P < 0,01$) respecto de “Machos 220 μm ”. &, &&, diferencias significativas ($P < 0,05$ y $P < 0,01$) entre sexos en una misma región. N=5.

En las hembras se observó una drástica reducción de la densidad de microglía con morfología reactiva ($F=9,093$; $P=0,000$), acompañada de un aumento significativo en la densidad de células con morfología no reactiva ($F=10,364$; $P=0,000$) conforme aumentaba la distancia a la lesión. Estos cambios fueron los responsables de que la densidad de células Iba1+ totales en hembras permaneciera estable a lo largo de las cinco regiones estudiadas.

La diferencia sexual en número total de células Iba1+ observada en la región 1 (Figura 7 E), se debió fundamentalmente al mayor número de células con morfología no reactiva en machos que en hembras (Figura 7 G); a pesar de que en esa región eran más abundantes las células con morfología reactiva en ambos sexos.

A continuación se estudió la polarización de la microglía reactiva hacia los fenotipos M1 (proinflamatorio) y M2 (reparador) en la región 1, mediante el análisis de la expresión de CD16/32 y de arginasa-1 en células inmunopositivas para Iba1. En torno a un 80% de las células Iba1+ en la proximidad de la lesión expresaban CD16/32, marcador de fenotipo M1, en ambos sexos (Figura 8 A-D). Sin embargo, el marcador de células con fenotipo M2 arginasa-1, se expresaba en un porcentaje de células Iba1+ significativamente mayor en machos que en hembras (Figura 9).

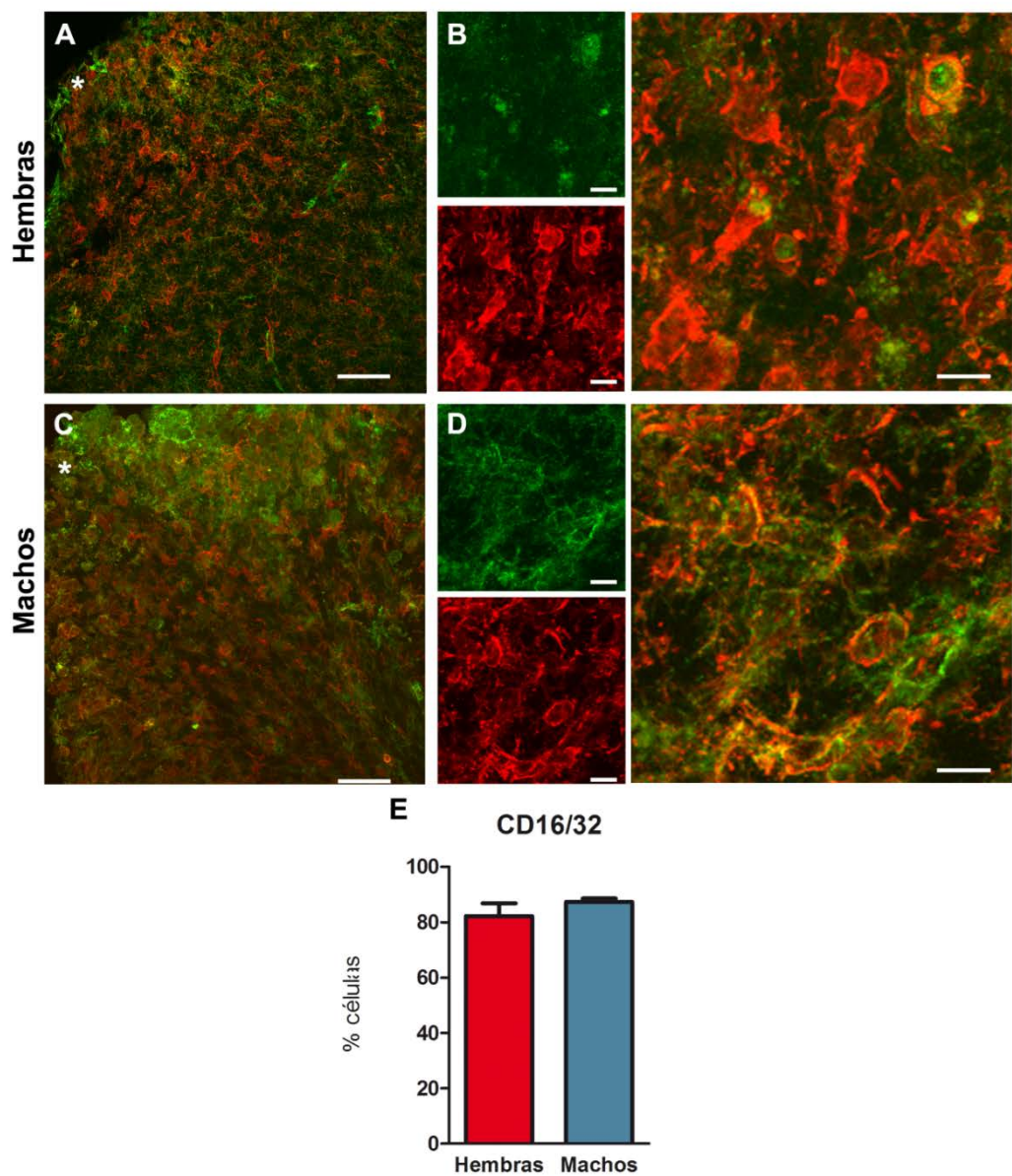


Figura 8. Análisis de la polarización de las células Iba1+ (rojo) en el borde de la lesión (asteriscos) hacia el fenotipo M1 (expresión de CD16/32, en verde) en hembras (A, B) y machos (C, D). Las barras de escala representan 50 μ m en A y C, y 10 μ m en B y D. Cuantificación del porcentaje de células Iba1+ que expresan CD16/32 (E). N=5.

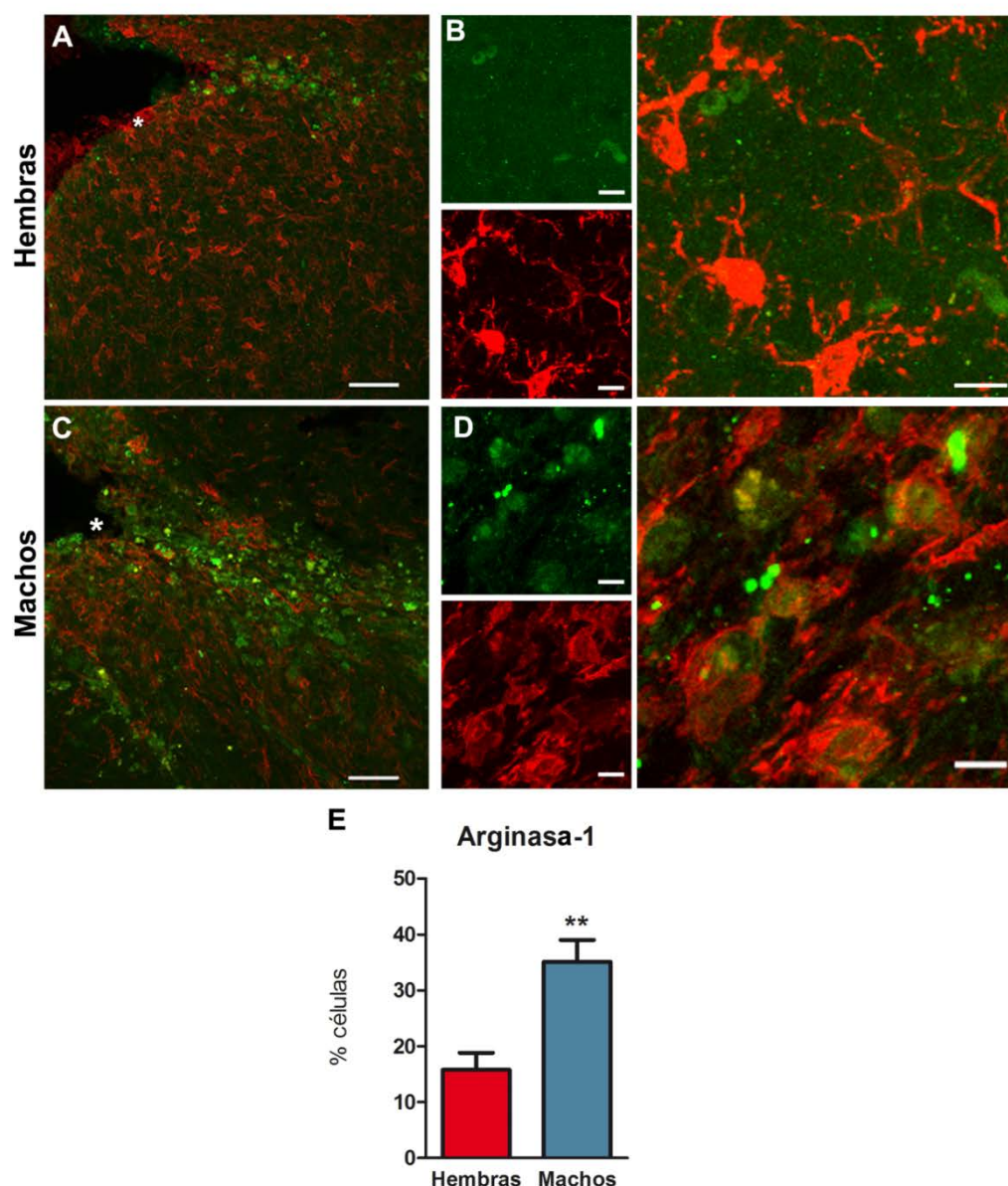


Figura 9. Análisis de la polarización de las células Iba1+ (rojo) en el borde de la lesión (asteriscos) hacia el fenotipo M1 (expresión de CD16/32, en verde) en hembras (A, B) y machos (C, D). Las barras de escala representan 50 μ m en A y C, y 10 μ m en B y D. Cuantificación del porcentaje de células Iba1+ que expresan CD16/32 (E). **, diferencia significativa ($P < 0,01$) respecto de "Hembras". N=5.

Para caracterizar mejor estas diferencias sexuales observadas en la microglía de la región 1, se realizaron inmunohistoquímicas dobles de fluorescencia contra Iba1 y neuroglobina (Ngb). Tal y como ya se había demostrado previamente (De Marinis, Acaz-Fonseca et al. 2013), la expresión de Ngb estaba restringida a la zona más próxima a la lesión, lo que corresponde con las regiones 1 y 2 de nuestro estudio (Figura 10 A, C).

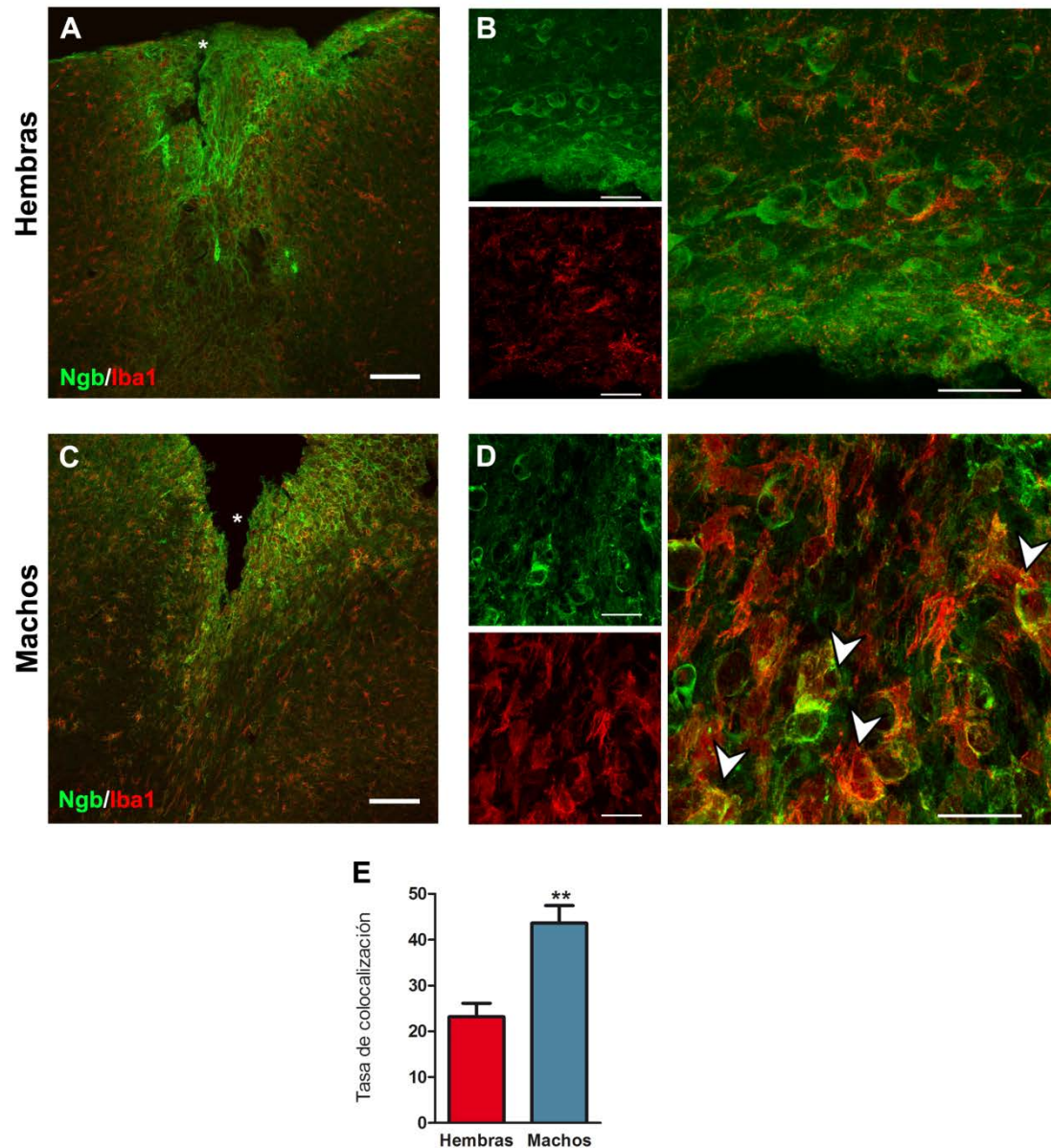


Figura 10. Análisis de la expresión de neuroglobina (verde) en células Iba1+ (rojo) del borde de la lesión (marcado con un asterisco), en hembras (A,B) y machos (C, D). Las barras de escala representan 100 μ m (A, C) o 25 μ m (B,D). Cuantificación del grado de colocalización de Ngb en células Iba1+ de la región 1 (E). **, diferencia significativa ($P<0,01$) respecto de "Hembras". N=5.

A pesar de que el área en la que se expresaba Ngb era similar en ambos sexos, sí se observó que la proteína mostraba un patrón de expresión celular sexodimórfico. En las hembras, la mayor parte de células inmunopositivas para Ngb tenían el aspecto de neuronas (Figura 10 B); mientras que en los machos Ngb mostraba una distribución más bien glial (Figura 10 D). De hecho, la cuantificación de la tasa de colocalización entre Iba1 y Ngb fue dos veces más alta en machos que en hembras (Figura 10 E).

En resumen, los machos mostraron un mayor número de células Iba1+ en el borde de la lesión (0-220 μm) que las hembras, y un mayor número de ellas mostraban una morfología no reactiva. Además, en los machos se observó una proporción mayor de microglía polarizada hacia el fenotipo M2, y un mayor grado de expresión de Ng2 en microglía que en las hembras.

2. RESPUESTA DE LA ASTROGLÍA A LA LESIÓN PENETRANTE

En la Figura 11 se muestran imágenes representativas de las inmunohistoquímicas contra GFAP y vimentina, realizadas para evaluar la respuesta de los astrocitos (totales y reactivos, respectivamente) a la lesión penetrante. La cuantificación de la densidad de astrocitos totales (Figura 11 E) reveló un aumento de estas células en el hemisferio lesionado comparado con el contralateral, en ambos sexos. No obstante, este aumento resultó estadísticamente significativo para la región comprendida entre 0 y 880 μm desde el borde de la lesión en los machos, mientras que en las hembras el incremento en células inmunopositivas para GFAP (GFAP+) se extendió hasta las 1100 μm . No se observaron diferencias sexuales en la densidad de células GFAP+ presentes en el hemisferio contralateral. En el hemisferio lesionado la distancia a la cicatriz tuvo un efecto significativo sobre la distribución de la densidad de células GFAP+ ($F=90,445$; $p=0,000$), pero el sexo no afectó a su distribución (Figura 11 A, B y E).

Sólo se detectaron células inmunopositivas para vimentina en el hemisferio lesionado, como cabía esperar. De nuevo, la distancia a la cicatriz en el hemisferio lesionado afectó significativamente a la distribución de células inmunopositivas para vimentina ($F=175,662$; $p=0,000$), pero no el sexo de los animales (Figura 11 C, D y F).

Como mecanismo para evaluar el grado de reactividad de los astrocitos, se calculó el cociente entre células inmunopositivas para vimentina (astrocitos reactivos) y para GFAP (astrocitos totales) en cada una de las cinco regiones estudiadas (Figura 11 G). Tampoco se observó ningún efecto del sexo sobre la distribución de esta variable, pero sí de la distancia a la lesión ($F=62,624$; $p=0,000$).

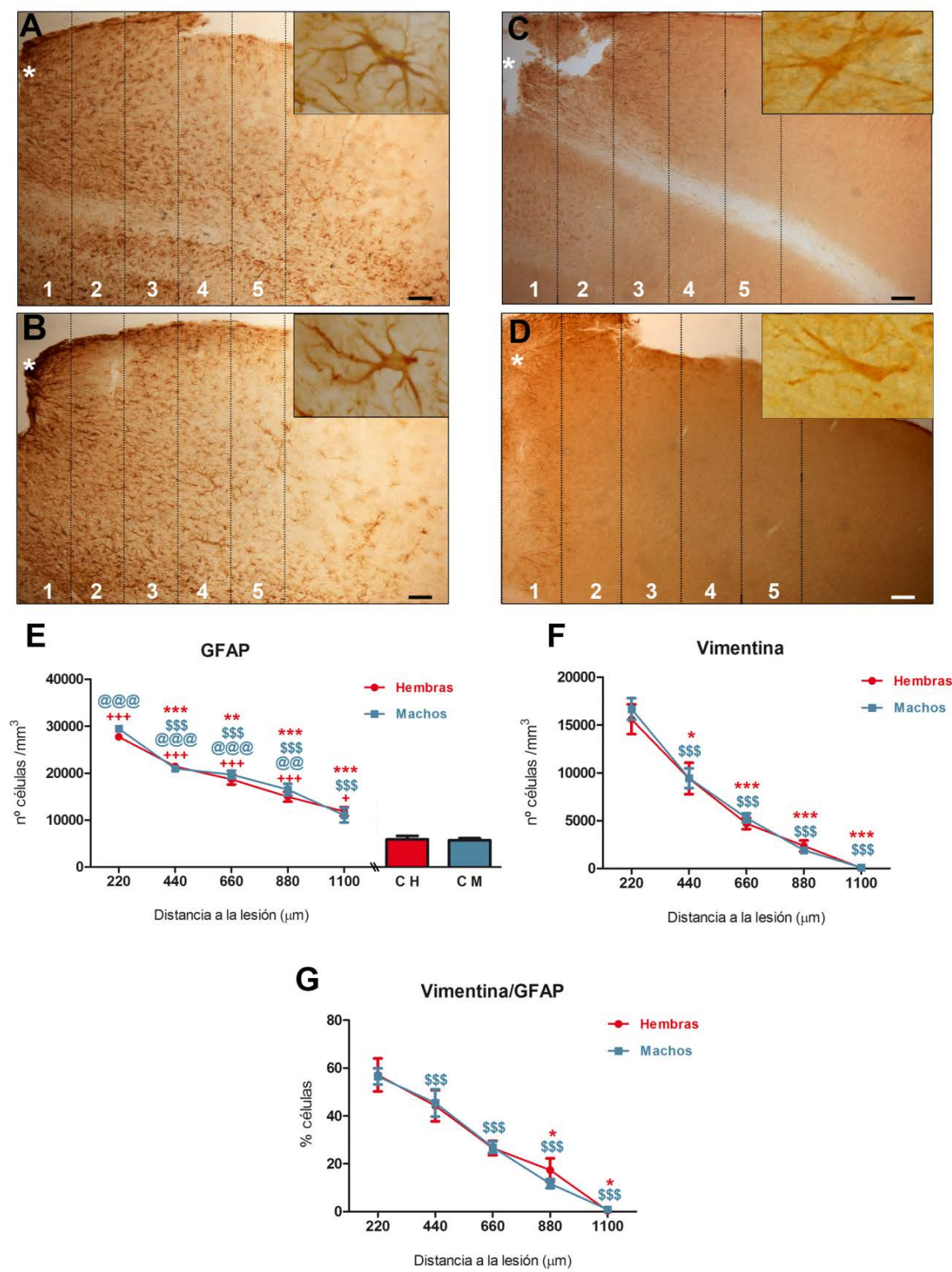


Figura 11. Inmunohistoquímica simple contra GFAP (A, B) y vimentina (C, D) en secciones cerebrales de hembras (A, C) y machos (B, D) sometidos a la lesión penetrante. Las líneas discontinuas delimitan las cinco regiones de estudio con respecto al borde de la lesión (asterisco). Las barras de escala representan 100 μm . Cuantificación del número de células inmunopositivas para GFAP (E) y vimentina (F) por unidad de volumen en cada región analizada. Representación del cociente entre células inmunopositivas para vimentina y GFAP en cada región analizada (G). *, **, ***, diferencias significativas ($P < 0,05$; $P < 0,01$ y $P < 0,005$) respecto de "Hembras 220 μm ". \$\$\$, diferencias significativas ($P < 0,005$) respecto de "Machos 220 μm ". CH y CM, cuantificación en el hemisferio contralateral de hembras y machos, respectivamente. N=5.

Para evaluar si las diferencias sexuales de densidad de células Iba1+ en el borde de la lesión pudieran estar causadas por diferencias en el fenotipo molecular de los astrocitos que forman la cicatriz glial, se estudió la expresión de CCL2 (proteína quimio-atrayente de macrófagos) en los astrocitos de la región 1 (Figura 12). El porcentaje de células inmunopositivas para GFAP que expresaron CCL2 fue dos veces más alto en machos que en hembras. Además se apreció un patrón de expresión subcelular diferente en cada sexo; siendo fundamentalmente nuclear en hembras, y citoplasmático en machos. A diferencia de lo observado en la microglía, no se apreciaron diferencias sexuales en cuanto al número y reactividad de astrocitos en la proximidad de la lesión. No obstante, sí se encontraron diferencias sexuales en la expresión de CCL2, proteína encargada del reclutamiento de macrófagos y microglía.

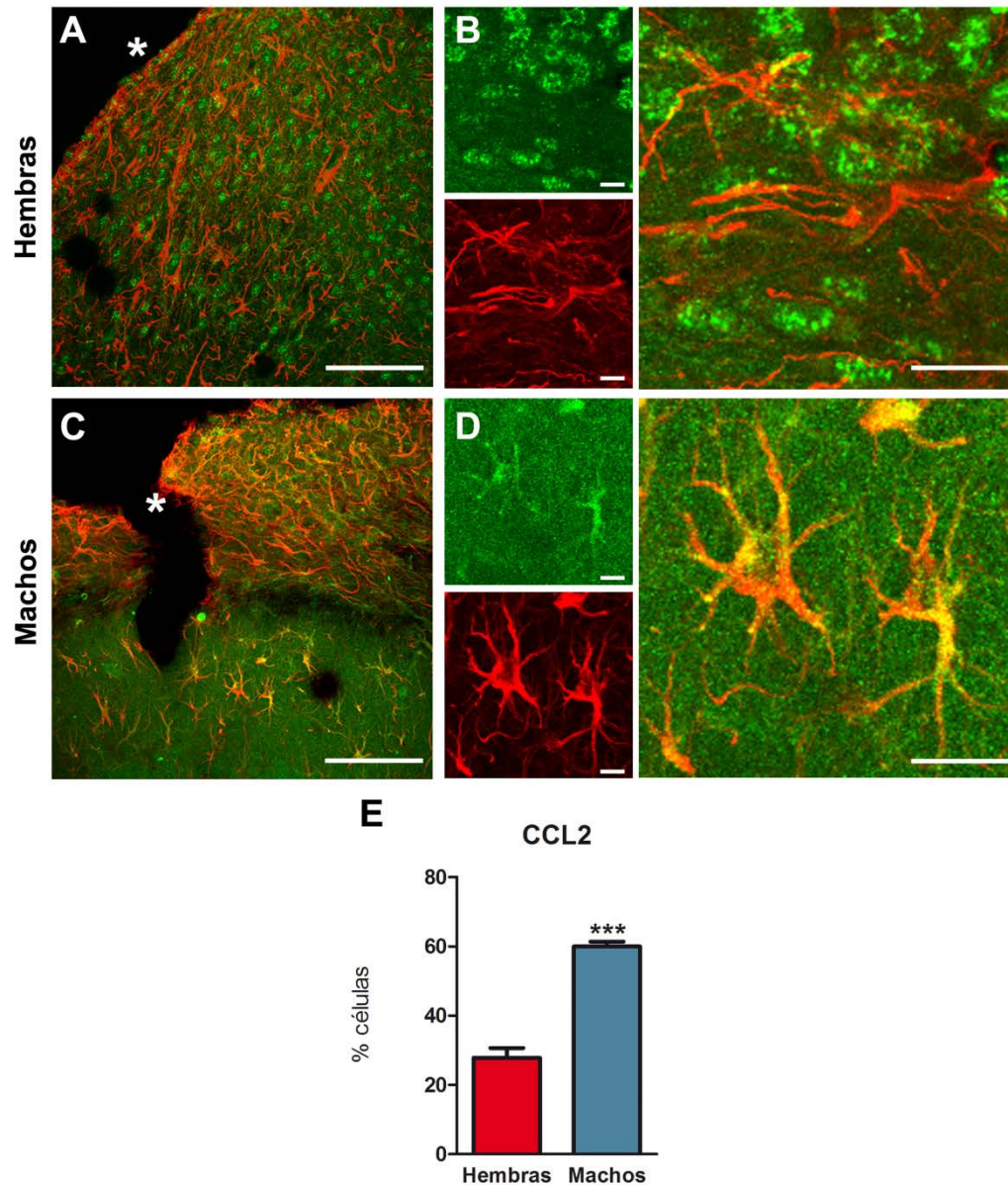


Figura 12. Inmunohistoquímica doble contra CCL2 (verde) y GFAP (rojo) en secciones cerebrales de hembras, en torno a la lesión penetrante (el borde de la lesión está indicado con un asterisco). Las barras de escala equivalen a 100 μ m (A, C) o a 10 μ m. Cuantificación del porcentaje de astrocitos que expresan CCL2 (E). ***, diferencia significativa ($P < 0,005$) respecto de "Hembras". N=5.

3. SUPERVIVENCIA NEURONAL

Una vez evaluados los cambios generados en las células de glía tras la lesión penetrante, se estudió su repercusión en la supervivencia de las neuronas. Se evaluó la densidad de neuronas cuantificando las células inmunopositivas para β III-tubulina (Figura 13) y NeuN (Figura 14) por unidad de volumen, tanto en el hemisferio lesionado como en el contralateral.

En el análisis de las secciones cerebrales marcadas con β III-tubulina se apreció una disminución significativa del número de neuronas en el hemisferio lesionado en comparación con el contralateral. Esta mengua resultó significativa en las 440 μ m más cercanas al borde de la lesión en machos, mientras que en las hembras la muerte neuronal se extendió hasta las 880 μ m. No se encontraron diferencias sexuales en la densidad neuronal del hemisferio contralateral (Figura 13 D). Dentro del hemisferio lesionado se observó un efecto significativo del sexo ($F=11,562$; $P=0,000$) y de la distancia a la lesión ($F=34,647$; $P=0,000$) sobre la distribución de la densidad de células inmunopositivas para β III-tubulina; sin detectarse una interacción entre ambos factores ($F=1,093$; $P=0,376$). En ambos sexos se apreció un aumento significativo de la densidad neuronal con la distancia a la lesión, pero esa recuperación celular empezó en la región 2 para los machos, mientras que en las hembras comenzó en la región 3. Además, los machos presentaron una densidad neuronal significativamente mayor que las hembras en las dos regiones más cercanas al borde de la lesión (0-440 μ m) (Figura 13 D).

Con el objetivo de profundizar en el análisis de la supervivencia neuronal tras la lesión, y de corroborar los resultados anteriores, se decidió cuantificar otro marcador de neuronas, NeuN. Igual que se apreciaba con β III-tubulina, la lesión generó una pérdida de células (núcleos celulares) inmunopositivas para NeuN (NeuN+) respecto del hemisferio contralateral en ambos sexos; aunque afectó a un área mayor de la corteza en hembras que en machos (Figura 14 A y B). Tampoco se detectaron diferencias sexuales en la densidad de células NeuN+ en el hemisferio contralateral (Figura 14 C).

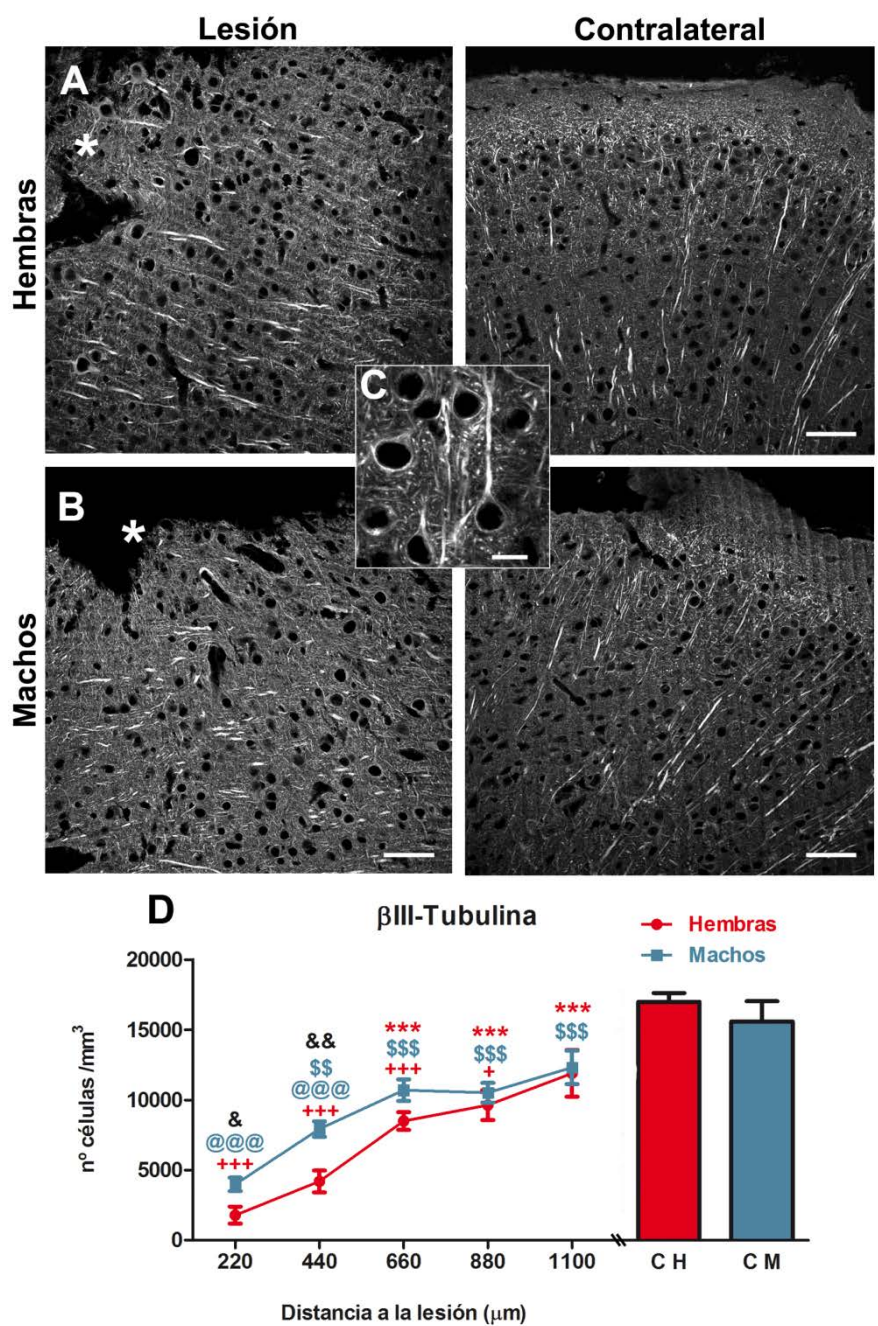


Figura 13. Inmunohistoquímica contra ̢III-tubulina en el hemisferio lesionado y en el contralateral de hembras (A) y machos (B). Los asteriscos marcan el borde de la lesión y las barras de escala representan 50 μm. C, ejemplos representativos de los que se consideraron células inmunopositivas para este marcaje (barra de escala equivale a 10 μm). D, Cuantificación de la densidad neuronal por unidad de volumen a lo largo del hemisferio lesionado, y en una porción equivalente del hemisferio contralateral de hembras (CH) y machos (CM). ***, diferencias sexuales ($P<0,005$) respecto de “Hembras 220 μm”. \$\$\$, ****, diferencias sexuales ($P<0,05$ y $P>0,005$) respecto de “Machos 220 μm”. &, &&, diferencias significativas ($P<0,05$ y $P<0,01$) entre los sexos para cada región estudiada. N=5.

En el hemisferio lesionado, también se observó un efecto significativo del sexo ($F=36,370$; $P=0,000$) y de la distancia a la lesión ($F=16,457$; $P=0,000$) sobre la distribución de células NeuN+. El aumento en la densidad de células marcadas con

dicho anticuerpo conforme aumenta la distancia a la lesión fue significativo a partir de la región 4 en machos y de la 5 en hembras. En el caso de NeuN también observamos que la supervivencia neuronal en torno a la lesión era significativamente mayor en machos que en hembras, aunque con este marcaje apreciamos que dicha diferencia sexual se extiende hasta las 880 μm del borde de la lesión (Figura 14 C).

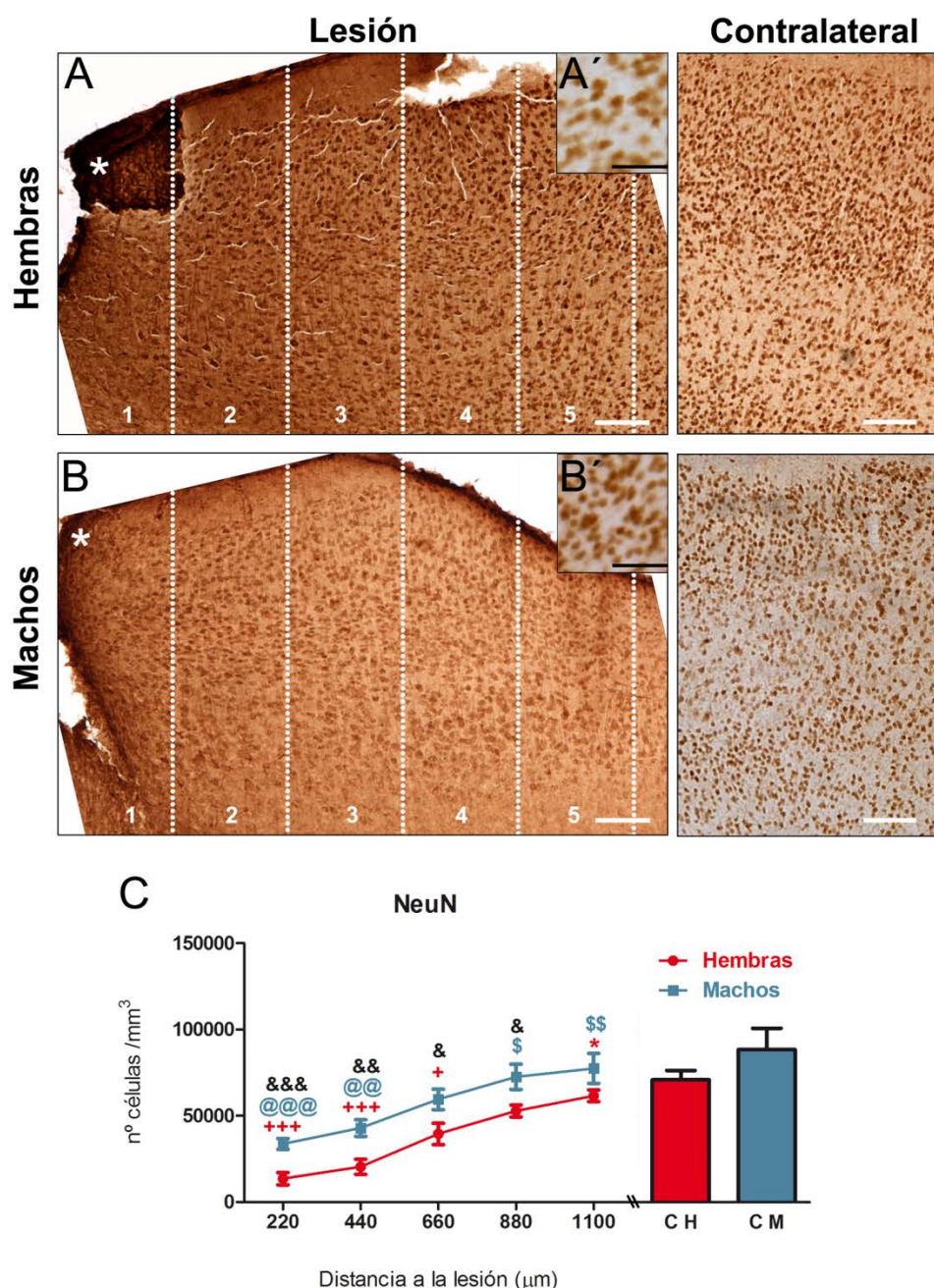


Figura 14. Inmunohistoquímica contra NeuN en el hemisferio lesionado y en el contralateral de hembras (A, A') y machos (B, B'). Los asteriscos marcan el borde de la lesión y las barras de escala representan 100 μm (A, B) o 50 μm (A', B'). C, Cuantificación de la densidad neuronal por unidad de volumen a lo largo del hemisferio lesionado, y en una porción equivalente del hemisferio contralateral de hembras (CH) y machos (CM). ***, diferencias sexuales ($P < 0.005$) respecto de "Hembras 220 μm ". \$\$, \$\$\$, diferencias sexuales ($P < 0.05$ y $P > 0.005$) respecto de "Machos 220 μm ". &, &&, diferencias significativas ($P < 0.05$ y $P < 0.01$) entre los sexos para cada región estudiada. N=5.

II. RUTAS DE SEÑALIZACIÓN IMPLICADAS EN LA INFLAMACIÓN (IN VITRO)

1. REGULACIÓN DE LA RUTA DE NOTCH EN INFLAMACIÓN

1.1. MODELO DE ASTROGLIOSIS IN VITRO

1.1.1. Caracterización del modelo

La estimulación de astrocitos *in vitro* con lipopolisacárido bacteriano (LPS) es un modelo de inflamación ampliamente usado en la bibliografía. Las células se trataron durante 24 horas con concentraciones crecientes de LPS, para evaluar su posible citotoxicidad mediante un ensayo de MTS. Sólo la dosis más alta (5 µg/mL) redujo significativamente la viabilidad de los astrocitos derivados de hembras, mientras que las células derivadas de machos mantuvieron intacta su actividad mitocondrial. De acuerdo con los resultados de este ensayo (Figura 15), se decidió emplear una dosis de 500 ng/mL en los siguientes experimentos.

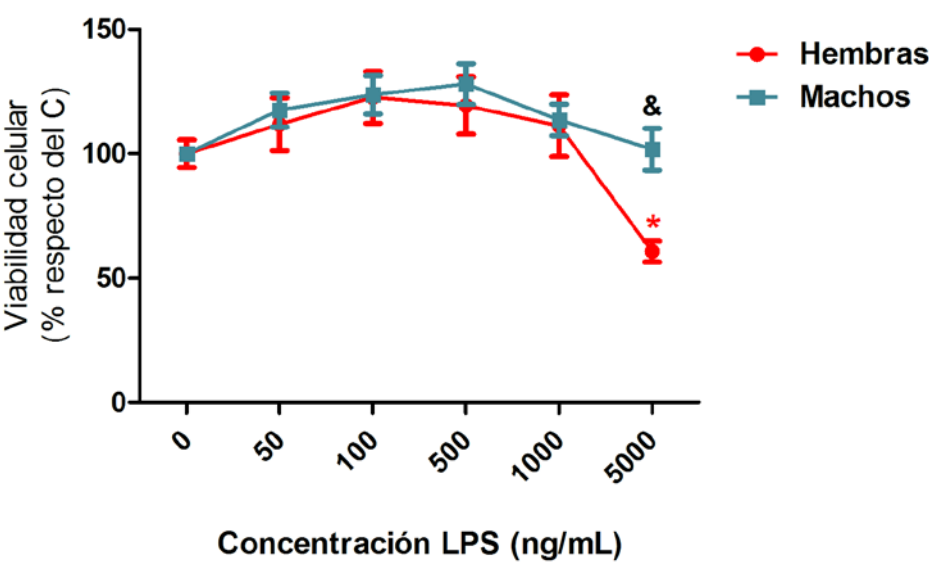


Figura 15. Ensayo de viabilidad por MTS. Los astrocitos corticales derivados de hembras y machos fueron tratados durante 24 h con concentraciones crecientes de LPS y se midió su actividad reductora. *, diferencia significativa ($P<0,05$) respecto de hembras 0 ng/mL. &, diferencia significativa ($P<0,05$) respecto de hembras 5000 ng/mL. N=3.

Una vez establecida la dosis de tratamiento, se caracterizó la respuesta inflamatoria de los astrocitos corticales en nuestro modelo experimental. En primer lugar se midió la transcripción de citoquinas proinflamatorias como interleuquina 6 (IL-

6), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y proteína 10 inducible por interferón gamma (IP-10). El tratamiento con LPS incrementó significativamente la expresión de todas las citoquinas analizadas, siendo este incremento similar en ambos sexos (Figura 16).

Asimismo se midió el cambio en la transcripción del factor inducible por hipoxia 1 alfa (HIF-1 α) y de la conexina 43 (Cx-43), proteína de uniones comunicantes (uniones *gap*) como marcadores de daño celular. La expresión de ARNm de HIF-1 α aumentó de manera significativa tras el tratamiento con LPS, tanto en células derivadas de machos como de hembras. Sin embargo, el LPS hizo disminuir significativamente la transcripción de Cx-43 en ambos sexos por igual (Figura 17).

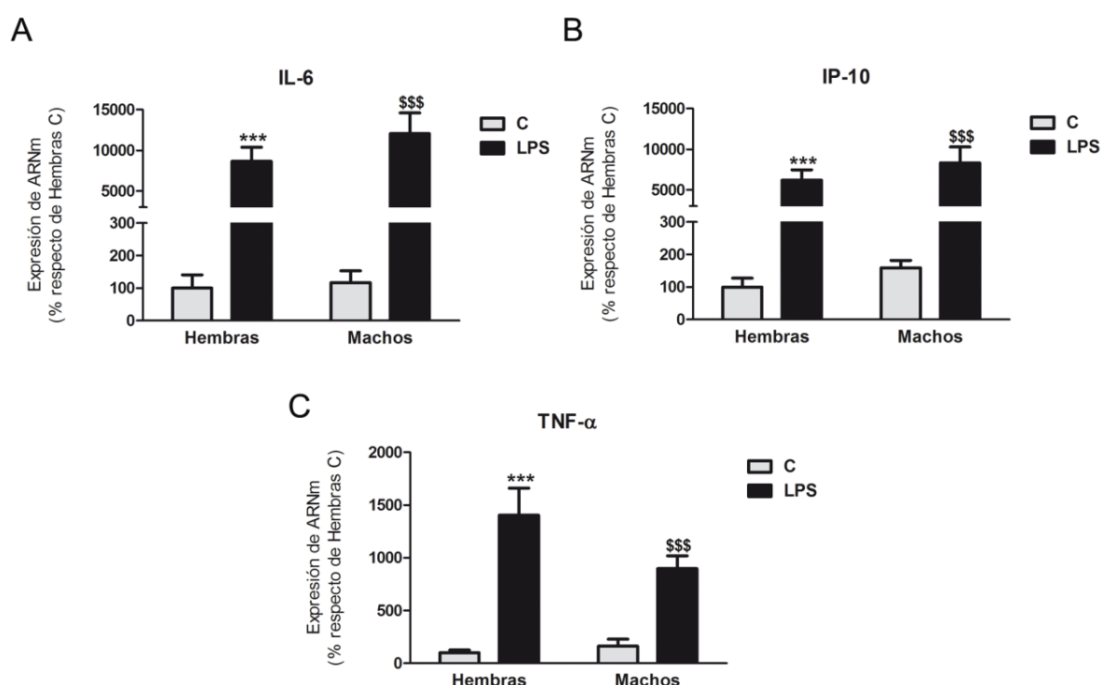


Figura 16. Expresión de ARNm de citoquinas proinflamatorias en astrocitos corticales de ratones de ambos sexos, tratados con LPS durante 24 h. ***, diferencias significativas ($P < 0,005$) respecto de hembras control. \$\$\$, diferencias significativas ($P < 0,005$) respecto de machos control. N=8.

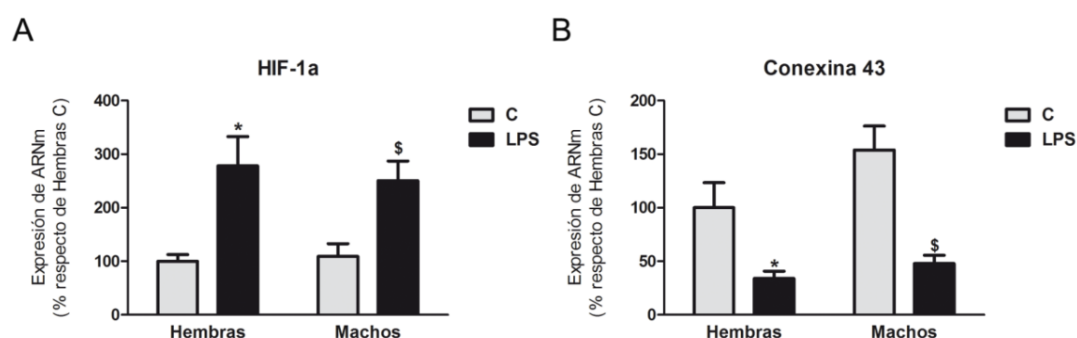


Figura 17. Expresión de ARNm de HIF-1 α y Conexina 43 en astrocitos corticales de ambos sexos tratados con LPS durante 24 h. *, diferencias significativas ($P < 0,05$) respecto de hembras control. \$, diferencias significativas ($P < 0,05$) respecto de machos control. N=6.

Durante el proceso de astrogliosis *in vivo* se observan alteraciones en los filamentos intermedios del citoesqueleto y un cambio morfológico de las células, que incluye hipertrofia y adquisición de formas estrelladas (Ridet et al. 1997; Pekny and Nilsson 2005; Sofroniew 2009). Por ello en nuestro modelo experimental también se analizó la expresión de GFAP y vimentina, así como la morfología celular (Figura 18). La transcripción de GFAP se vio reducida de manera significativa tras el tratamiento con LPS en ambos sexos (Figura 18 A); sin embargo estos cambios de ARNm no se tradujeron en cambios en su expresión proteica (Figura 18 B). La expresión de ARNm de vimentina (Figura 18 C) disminuyó de manera significativa en las células derivadas de hembras, pero no en las procedentes de machos. A pesar de no detectarse cambios en la cantidad total de GFAP tras el tratamiento, se estudió su distribución celular mediante inmunocitoquímica (Figura 18 D). En función de dicha distribución, se clasificó a los astrocitos en tres categorías morfológicas: poligonales, bipolares y estrelladas (Figura 6). La respuesta al LPS fue similar en ambos sexos y consistió en un aumento significativo del porcentaje de células bipolares, en detrimento de las poligonales.

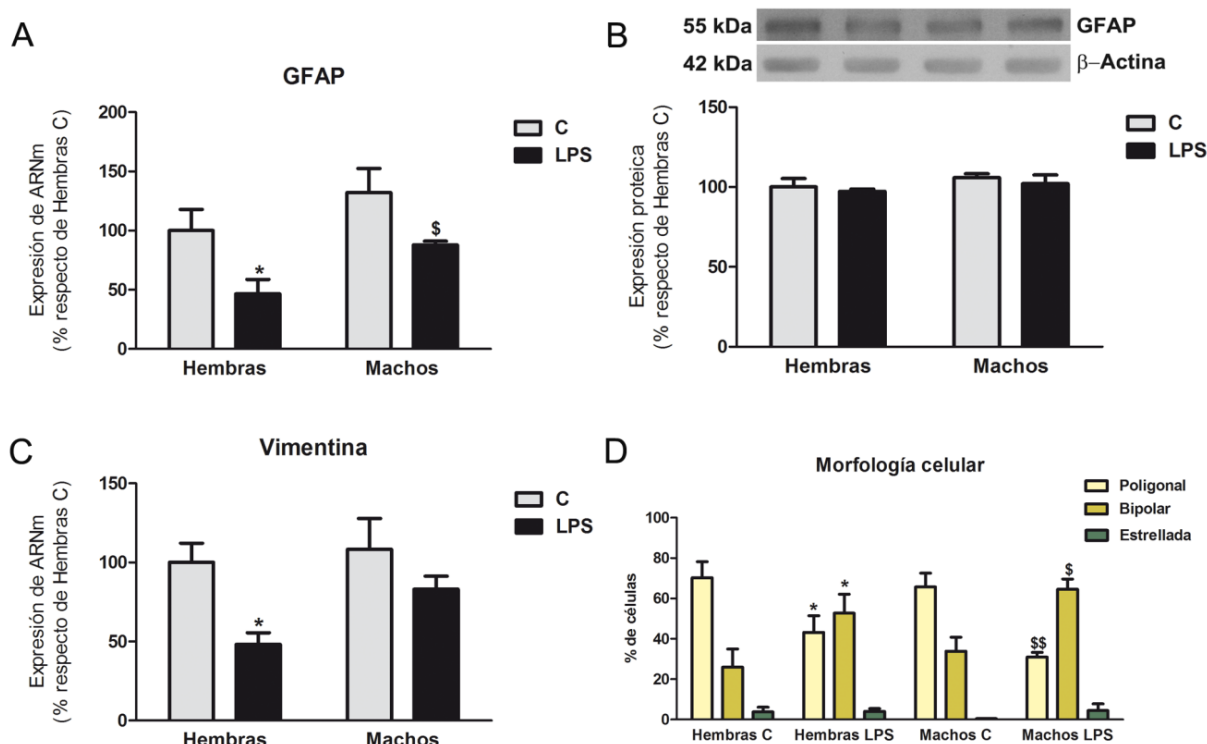


Figura 18. Estudio del citoesqueleto en astrocitos corticales expuestos a LPS durante 24 h. *, diferencias significativas ($P < 0,05$) respecto de hembras control. \$, \$\$, diferencias significativas ($P < 0,05$ y $P < 0,01$) respecto de machos control. $N \geq 4$.

1.1.2. Modulación de la ruta de señalización de Notch por LPS en astrocitos corticales.

Una vez caracterizados los efectos inflamatorios que el LPS tenía sobre los astrocitos corticales, se procedió a estudiar el comportamiento de la ruta de señalización de Notch en nuestro modelo. En la Figura 19 se muestra el curso temporal del efecto del LPS sobre la expresión génica de los efectores de la ruta Hes-1 y Hes-5, del receptor Notch-1 y del ligando Jag-1, en astrocitos corticales derivados de ratones hembra y macho.

El tratamiento con LPS durante 14, 24 y 48 h redujo los niveles de expresión de Hes-5 de manera significativa en ambos sexos, sin modular la respuesta de Hes-1. La transcripción de Notch-1 disminuyó significativamente tras el tratamiento con LPS durante 24 h. La expresión de ARNm de Jag-1 en hembras se vio incrementada tras los tratamientos con LPS durante 14, 24 y 48 h; en los astrocitos derivados de machos se observaron las mismas tendencias pero sólo el tratamiento de 24 h de duración indujo un cambio estadísticamente significativo.

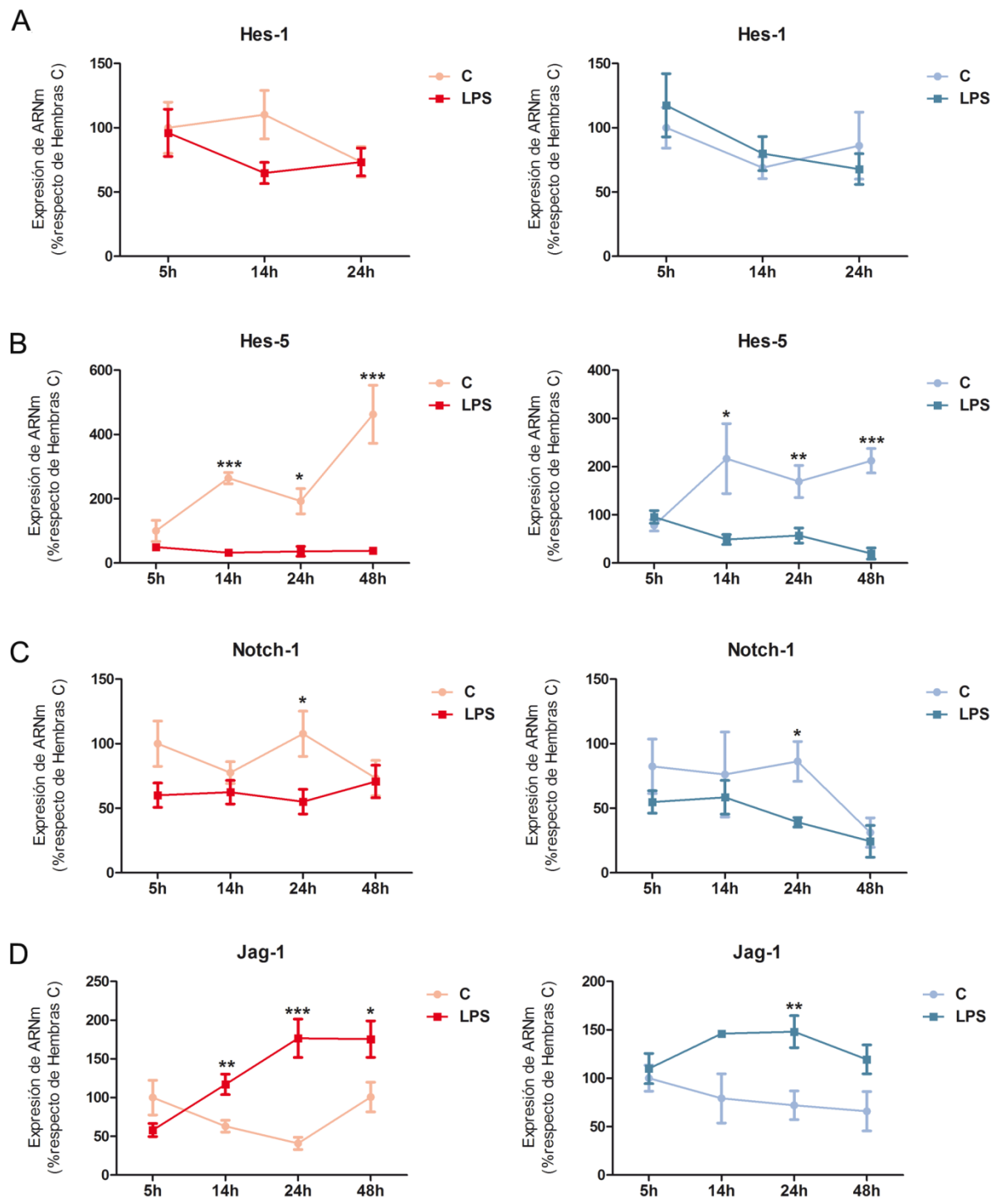


Figura 19. Efecto temporal del LPS sobre la expresión de ARN mensajero de Hes-1 (A), Hes-5 (B), Notch-1 (C) y Jag-1 (D), en astrocitos corticales derivados de hembras (columna izquierda) y de machos (columna derecha). *, **, ***, diferencias significativas ($P < 0,05$; $P < 0,01$ y $P < 0,005$, respectivamente) respecto del grupo control para cada tiempo de tratamiento. N=5.

Exceptuando estas diferencias en la expresión de ARNm de Jag-1, se vio que la respuesta de la ruta de Notch ante un estímulo inflamatorio era la misma en los astrocitos corticales derivados de ratones de ambos sexos. Dado que no se

encontraron diferencias sexuales en intensidad ni en tiempo de respuesta al LPS, en los siguientes experimentos con astrocitos corticales se decidió unificar los resultados obtenidos con células de ambos sexos. Además, del estudio de los efectos temporales del LPS se observó que el tratamiento durante 24 h era el que regulaba más claramente la ruta de Notch. Por ello se escogió este tiempo de tratamiento para profundizar sobre el comportamiento de la ruta de señalización.

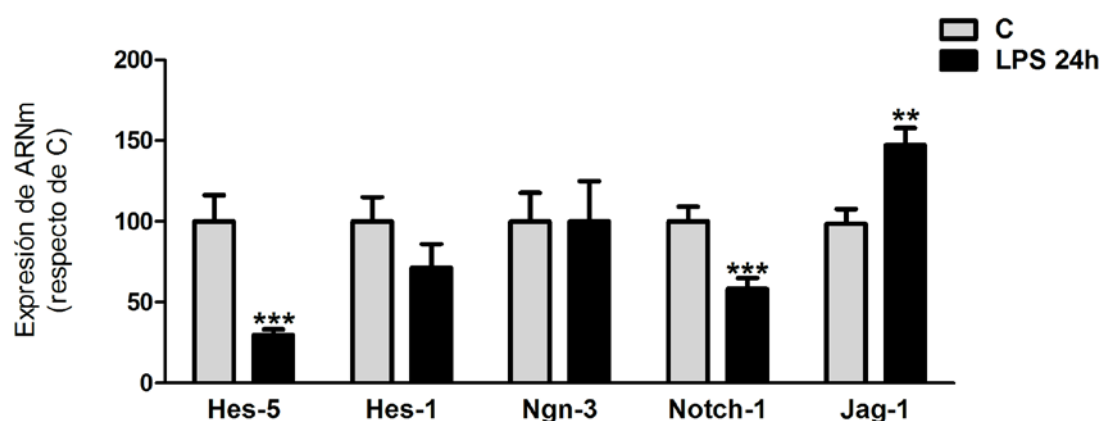


Figura 20. Resumen del efecto del LPS sobre la ruta de señalización de Notch en astrocitos corticales. **, ***, diferencias significativas ($P < 0,01$ y $P < 0,005$, respectivamente) respecto del grupo control (C). $N \geq 8$.

En resumen, en los astrocitos corticales el tratamiento con LPS durante 24 h redujo selectivamente la transcripción de Hes-5, pero no moduló la de su homólogo Hes-1, ni la del efector secundario que es regulado por él (Ngn-3). La transcripción del receptor Notch-1 también fue regulada a la baja, sin embargo la expresión de ARNm del ligando Jag-1 aumentó significativamente tras el tratamiento.

1.1.3. Modulación de la ruta de señalización de Notch por LPS en astrocitos hipotalámicos.

La estimulación con LPS durante 24 h de los astrocitos hipotalámicos también moduló en ellos la transcripción de los genes de la ruta de Notch (Figura 21). Sin embargo, al contrario de lo que observamos en astrocitos corticales, el LPS redujo la transcripción de Hes-1 en los astrocitos de hipotálamo, pero no modificó la de Hes-5. La expresión de ARNm de Notch-1 disminuyó y la de Jag-1 aumentó tras el tratamiento con LPS, igual que lo que sucedió en los astrocitos corticales.

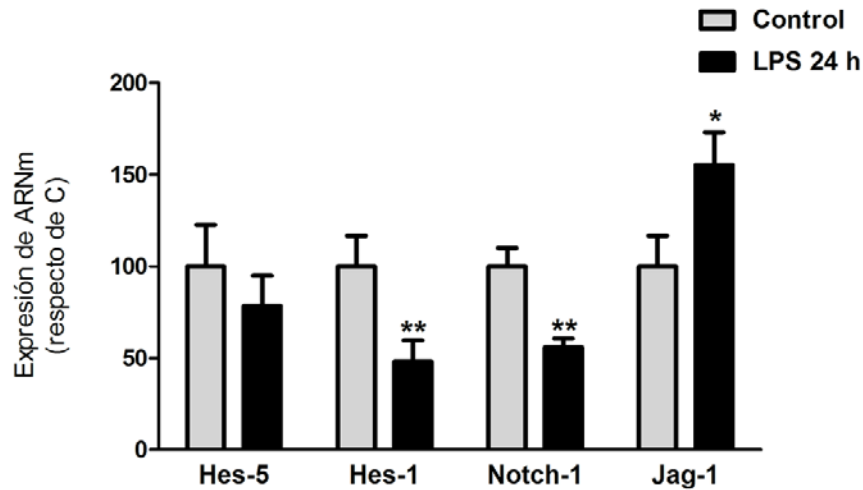


Figura 21. Modulación de la expresión de los genes de Notch en astrocitos hipotalámicos estimulados con LPS durante 24 h. *, **, diferencias significativas ($P<0,05$ y $P<0,01$) respecto del grupo control. N=7.

1.2. MODELO DE LESIÓN PENETRANTE *IN VIVO*

Con objeto de corroborar los resultados obtenidos en el modelo anterior, se decidió estudiar el comportamiento de la ruta de señalización de Notch en condiciones de neuroinflamación *in vivo*. Se escogió el modelo de lesión cortical penetrante, ya que genera una fuerte reactividad glial localizada en torno a la lesión. Esto nos permitió analizar la expresión génica en el tejido cerebral altamente inflamado y compararlo con una porción similar de corteza cerebral de los animales control.

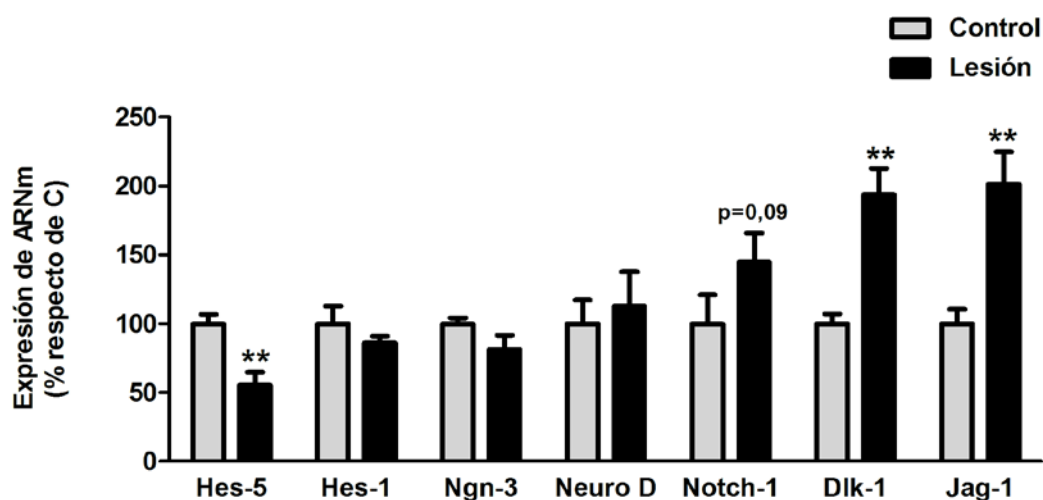


Figura 22. Expresión de ARNm de los genes de la ruta de Notch en corteza cerebral de animales control o sometidos a lesión penetrante. **, diferencias significativas ($P<0,01$) respecto del grupo control. N=5.

Como se muestra en la Figura 22, la lesión penetrante regula la ruta de señalización de Notch en el tejido cortical. La lesión reduce la expresión de Hes-5, pero

no modifica la expresión de Hes-1. Tampoco fue alterada la expresión de los factores de transcripción Ngn-3 y NeuroD, regulados por Hes-1. La transcripción de los dos ligandos estudiados, Jag-1 y Dlk-1, aumentó en el tejido lesionado comparado con el control. En este modelo no se modificó la expresión de ARNm del receptor Notch-1 de manera significativa, aunque mostró una ligera tendencia a aumentar respecto del grupo control.

La regulación de la ruta de Notch en este modelo de inflamación *in vivo* es muy similar a la que el LPS ejerce sobre los astrocitos corticales *in vitro*. La única diferencia entre ambos modelos radica en la respuesta del receptor Notch.

2. MODULACIÓN DE LA RUTA DE NOTCH POR AGENTES ANTI-INFLAMATORIOS Y NEUROPROTECTORES

Parte de los efectos neuroprotectores de los estrógenos, de la progesterona y del IGF-1 se deben a su acción sobre los astrocitos, en los que regulan la respuesta inflamatoria. Dado que en nuestro modelo de astrogliosis la ruta de Notch estaba siendo regulada, se estudió la posibilidad de que los efectos antiinflamatorios de dichos compuestos implicasen la restauración de los niveles de expresión de los genes de la ruta de Notch.

Las concentraciones de las moléculas neuroprotectoras que fueron empleadas en los siguientes experimentos habían demostrado previamente su capacidad antiinflamatoria en astrocitos (Kipp et al. 2007; Cerciati et al. 2010; Bellini et al. 2011).

2.1. 17 β -ESTRADIOL

Los tratamientos con 17 β -estradiol (0,1 nM) durante 24 h no revirtieron los efectos del LPS sobre la transcripción de los genes de la ruta de Notch en los astrocitos corticales, ni tampoco regularon su expresión en ausencia del estímulo inflamatorio (Figura 23).

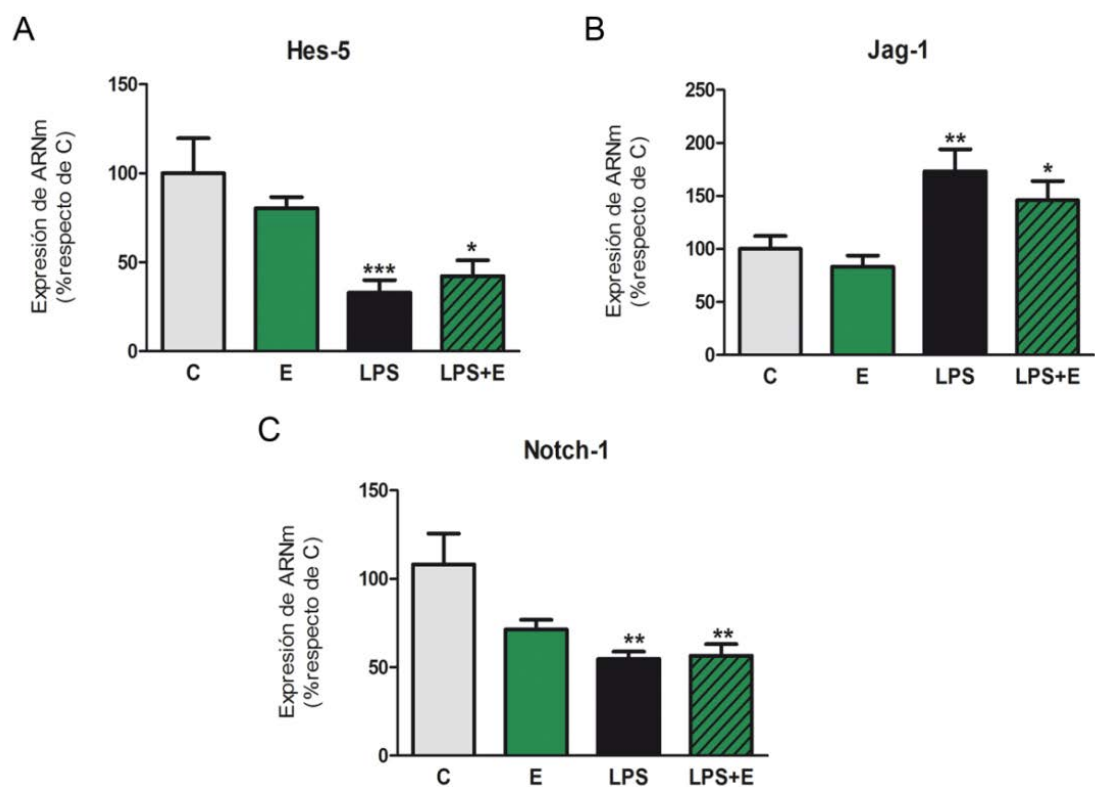


Figura 23. Efecto del 17 β -estradiol sobre la ruta de Notch en astrocitos corticales, en ausencia o presencia de LPS. *, **, ***, diferencias significativas ($P < 0,05$; $P < 0,01$ y $P < 0,005$ respectivamente) respecto del control. N=10.

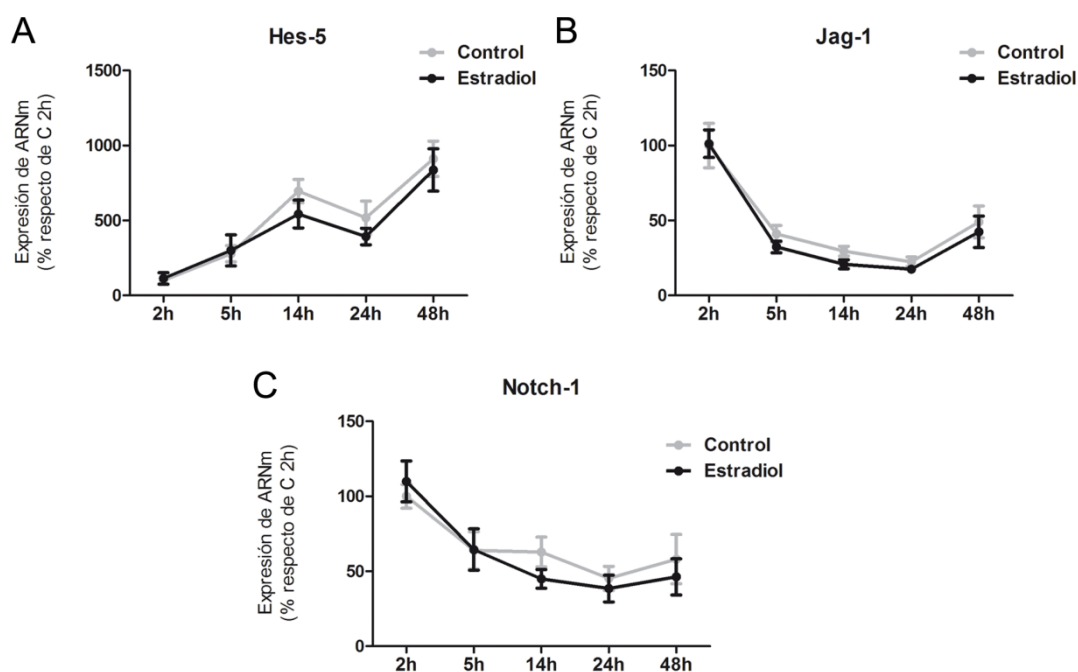


Figura 24. Efecto temporal del 17 β -estradiol sobre la expresión de ARN mensajero de Hes-5 (A), Jag-1 (B) y Notch-1 (C) en astrocitos corticales. N \geq 8.

La ausencia de modulación de la ruta de Notch por parte del 17β -estradiol aplicado durante 24 h contradecía literatura previa en neuronas (Ruiz-Palmero et al. 2011), por lo que se realizó un estudio del efecto del estradiol aplicado durante distintos tiempos de tratamiento en los astrocitos corticales *in vitro* (Figura 24). En ninguno de los tiempos de tratamiento estudiados se observó un efecto regulatorio de la hormona sobre la expresión de ARNm de los genes de la ruta de Notch. Por lo que el tiempo de exposición a la hormona quedó descartado como posible factor de influencia en nuestro modelo.

Los astrocitos murinos *in vitro* presentan actividad aromatasa (Liu et al. 2007, 2008; Peruffo et al. 2008), y por lo tanto en condiciones basales hay cierta producción de 17β -estradiol en los cultivos. Ante la posibilidad de que la dosis de 17β -estradiol empleada en los tratamientos fuese demasiado baja y estuviese enmascarada por el estradiol endógeno, se usó letrozol (LTZ) para bloquear la actividad aromatasa. Como se muestra en la Figura 25, el tratamiento con LTZ no alteró la transcripción génica de Hes-5, de Jag-1 ni de Notch-1 en condiciones basales. Además, el inhibidor de aromatasa tampoco modificó la respuesta que dichos genes habían mostrado ante los tratamientos con LPS o con 17β -estradiol.

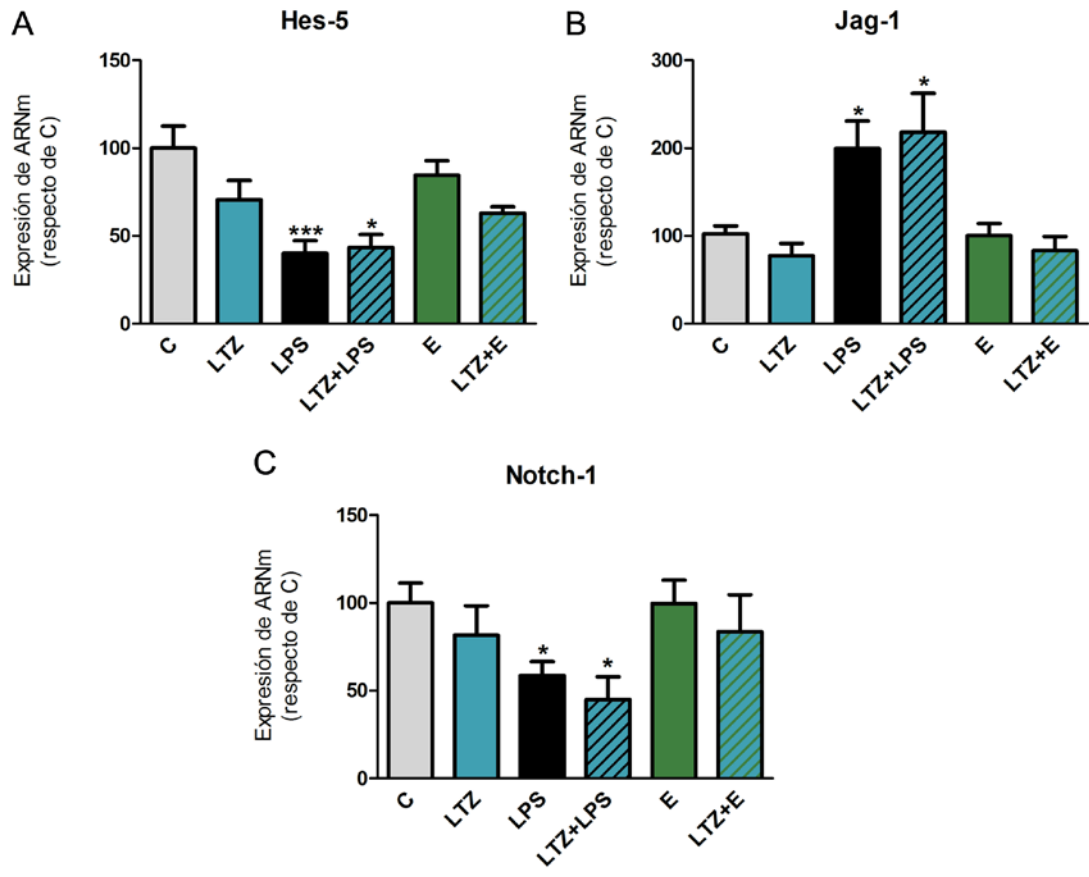


Figura 25. Efecto del letrozol (LTZ) sobre la expresión de ARNm de la ruta de Notch en presencia o ausencia de LPS o 17 β -estradiol (E) en astrocitos corticales. *, ***, diferencias significativas ($P < 0.05$ y $P < 0.005$) respecto del grupo control (C). $N \geq 6$.

Descartado el factor de la dosis de estradiol empleada, y debido a que el hipotálamo es una región especialmente susceptible a la acción de las hormonas, también analizamos el efecto del 17 β -estradiol sobre la expresión de los genes de la ruta de Notch en los astrocitos hipotalámicos (Figura 26). Sin embargo, y tal como sucedía en los astrocitos corticales, la hormona no alteró la transcripción de los genes estudiados en condiciones basales. En condiciones inflamatorias el tratamiento con 17 β -estradiol revirtió el efecto que el LPS había inducido en la expresión de ARNm de Jag-1, pero no revirtió los efectos del LPS sobre Hes-1 ni Notch-1.

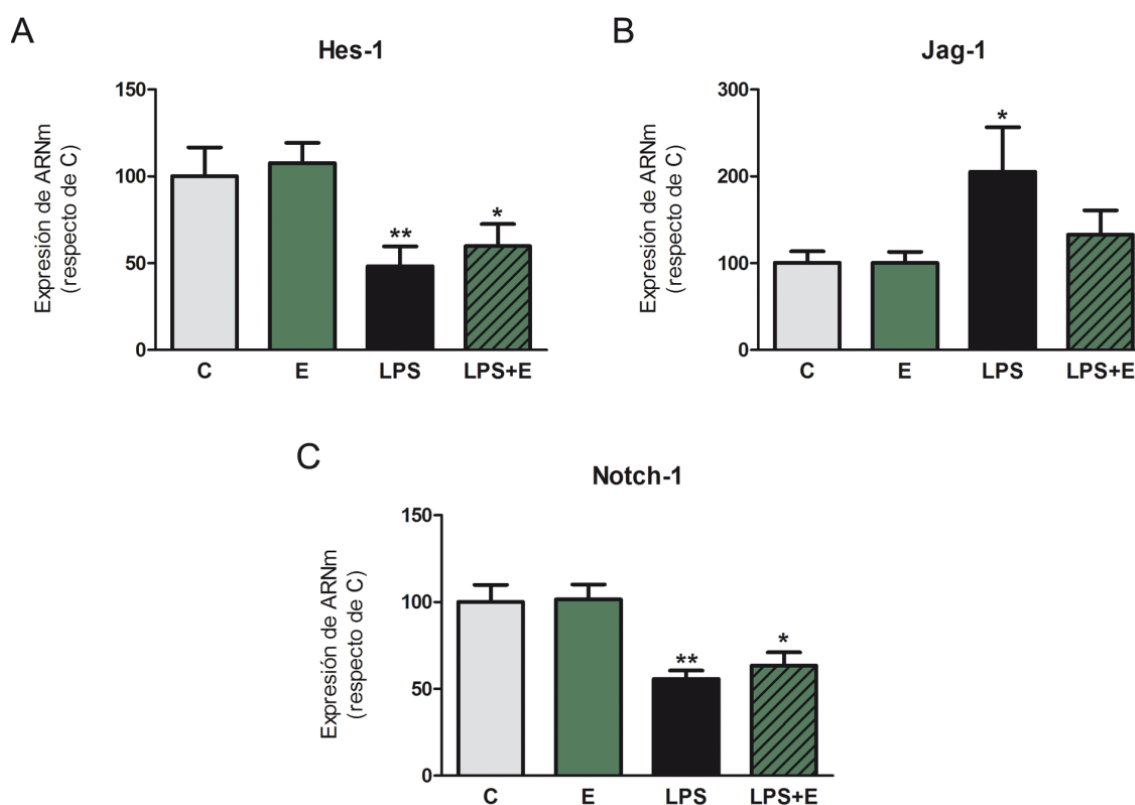


Figura 26. Efecto del 17 β -estradiol sobre la expresión de ARNm de Hes-1 (A), Jag-1 (B) y Notch-1 (C) en ausencia o presencia de LPS en astrocitos hipotalámicos. *, **, diferencias significativas ($P < 0,05$ y $P < 0,001$) con respecto al grupo control. N=7.

2.2. MODULADORES SELECTIVOS DE LOS RECEPTORES DE ESTRÓGENOS (SERMs)

Los SERMs pueden ejercer funciones estrogénicas y antiestrogénicas dependiendo del tejido o tipo celular sobre el que actúen. Debido a esta característica, que los diferencia del 17 β -estradiol, estudiamos el efecto de cuatro SERMs (tamoxifeno, raloxifeno, ospemifeno y bazedoxifeno) sobre la expresión de los genes de la ruta de Notch en condiciones inflamatorias en los astrocitos corticales (Figura 27).

Ninguno de los SERMs estudiados revirtió el efecto que el LPS había inducido sobre la expresión de Hes-5 ni de Notch-1. Sin embargo, y al contrario que el 17 β -estradiol, todos ellos retornaron a niveles del control la expresión de ARNm del ligando Jag-1.

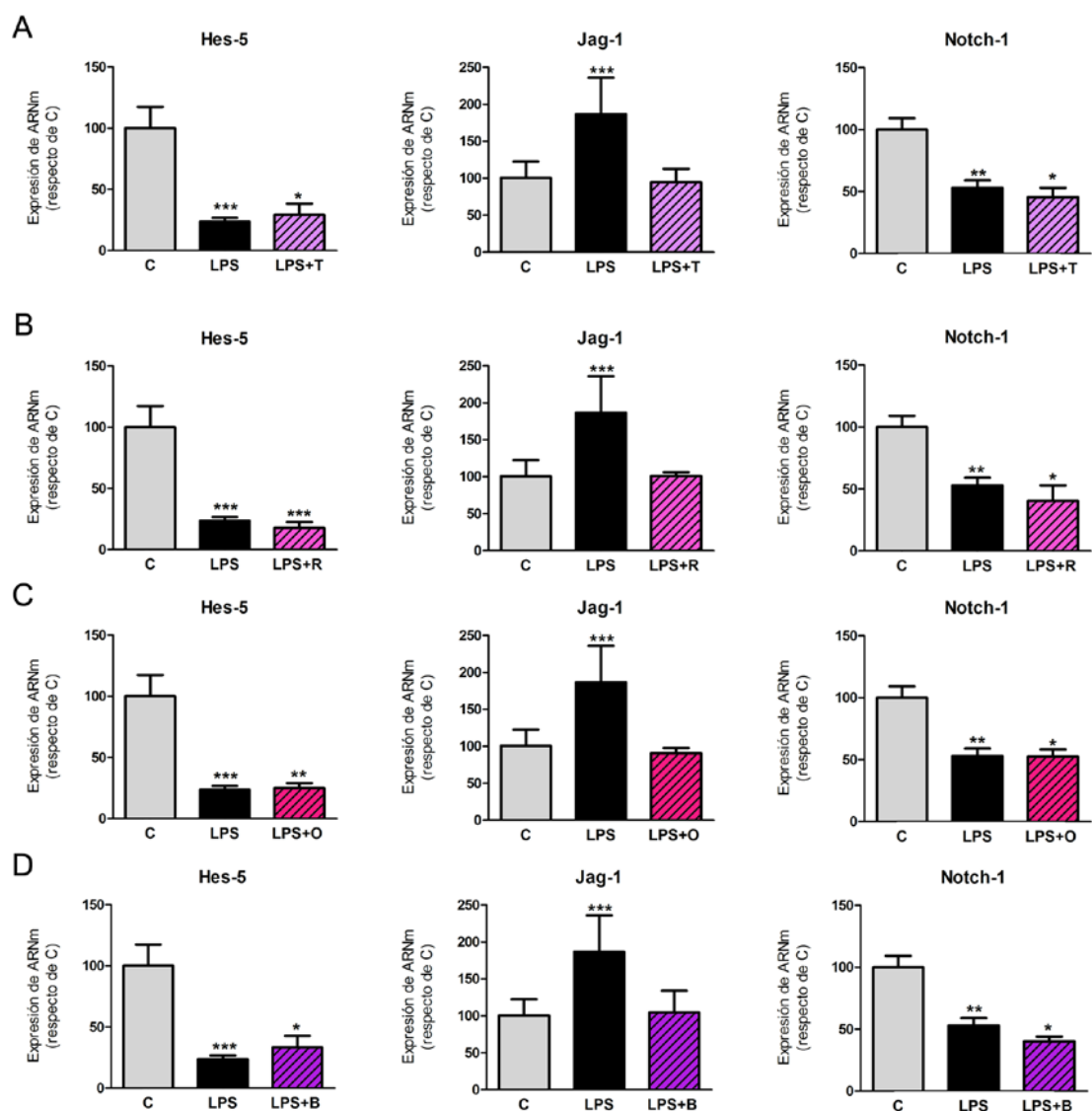


Figura 27. Expresión de ARNm de los genes de la ruta de Notch en astrocitos corticales estimulados con LPS y tamoxifeno (A), raloxifeno (B), ospemifeno (C) o bazedoxifeno (D). *, **, ***, diferencias significativas ($P < 0,05$; $P < 0,01$ y $P < 0,005$) con respecto al grupo control. N=6.

2.3. PROGESTERONA

El estudio de la posible regulación de la ruta de Notch por parte de la progesterona (P) se llevó a cabo usando dos concentraciones diferentes de la hormona (0,1 y 10 nM). Tal y como se muestra en la Figura 28, los tratamientos con progesterona no modificaron la expresión de los genes analizados en condiciones basales ni en condiciones inflamatorias. El LPS mantuvo sus efectos sobre la expresión génica, independientemente de la presencia o ausencia de la hormona en el medio de cultivo.

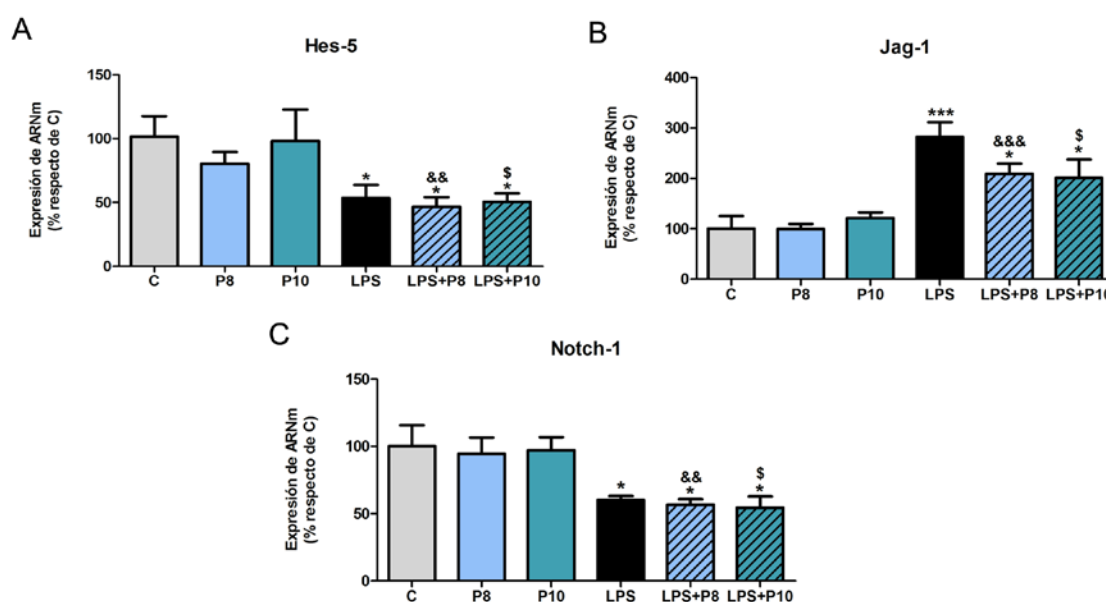


Figura 28. Efecto de la progesterona (concentraciones 1×10^{-8} M (P8) y 1×10^{-10} M (P10)) sobre la expresión de ARNm de los genes de la ruta de Notch en astrocitos corticales, en ausencia o presencia de LPS. *, ***, diferencias significativas ($P < 0,05$ y $P < 0,005$) respecto del control. &, &&, &&&, diferencias significativas ($P < 0,01$ y $P < 0,005$) respecto de P8. \$ diferencias significativas ($P < 0,05$) respecto de P10. N=5.

2.4. FACTOR DE CRECIMIENTO INSULÍNICO TIPO 1 (IGF-1)

En la Figura 29 se recogen los resultados correspondientes al tratamiento de los astrocitos corticales con IGF-1 en ausencia y en presencia de LPS. El análisis de la varianza reveló que ambos factores (IGF-1 y LPS) ejercían un efecto significativo sobre la expresión de Hes-5 y de Jag-1; mientras que la expresión de ARNm de Notch-1 sólo se vio modulada de manera significativa por LPS.

En condiciones basales el IGF-1 indujo un incremento en la expresión de ARNm del efector Hes-5 y una disminución significativa en la expresión de ARNm del ligando Jag-1 (efectos opuestos a los ejercidos por LPS), mientras que la transcripción de Notch-1 permaneció inalterada.

La interacción estadística entre LPS e IGF-1 sólo resultó ser significativa en el caso de Hes-5. No obstante, el tratamiento con IGF-1 en condiciones inflamatorias devolvió a valores control los niveles de expresión de ARNm de todos los genes analizados. La adición de IGF-1 al medio en presencia de LPS alteró significativamente la expresión de Notch-1 y Jag-1 con respecto al grupo LPS, mientras que sólo podemos hablar de tendencia no significativa en el caso de Hes-5.

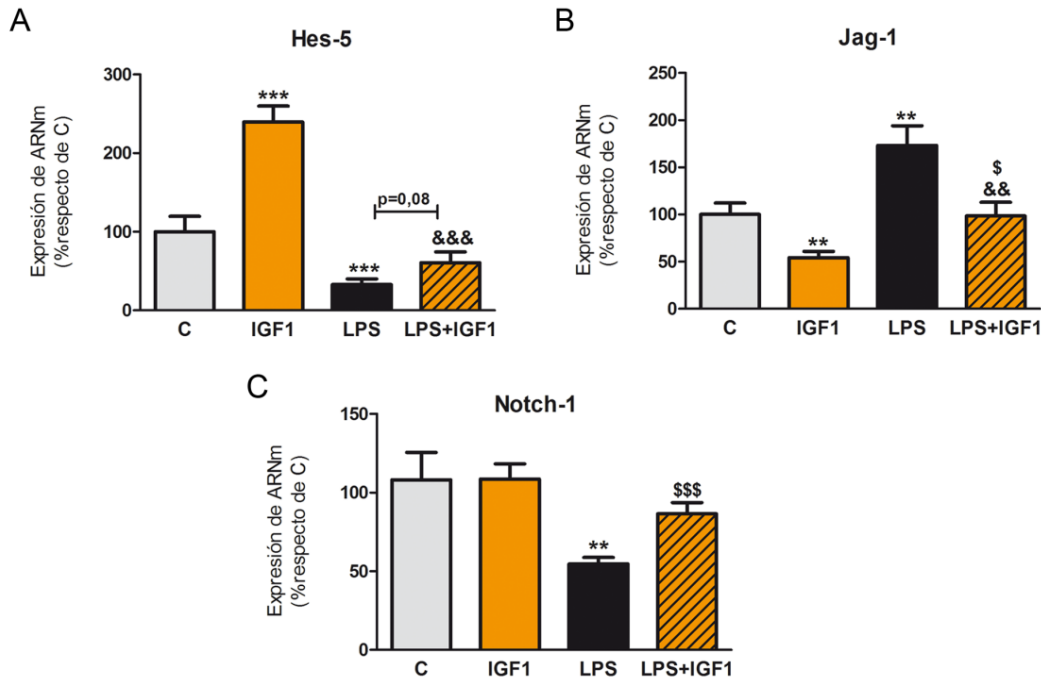


Figura 29. Efecto del IGF-1 sobre la ruta de Notch en astrocitos corticales, en ausencia o presencia de LPS. **, ***, diferencias significativas ($P<0,01$ y $P<0,005$) respecto del control. &&, &&&, diferencias significativas ($P<0,01$ y $P<0,005$) respecto de IGF-1. \$, \$\$\$, diferencias significativas ($P<0,05$ y $P<0,005$) respecto de LPS. N=10

A continuación se exploró la posible interacción entre IGF-1 y estradiol, mediante su administración conjunta al medio de cultivo en ausencia y en presencia de LPS (Figura 30). El análisis de la varianza de tres vías mostró un efecto significativo del LPS y del IGF-1 sobre la expresión de ARNm de Hes-5, Notch-1 y Jag-1; así como una interacción significativa entre estos dos factores (sólo en el caso de Hes-5 y Notch-1). Sin embargo, el 17β -estradiol no tuvo un efecto significativo sobre la distribución de ninguna de las variables, ni mostró interacciones significativas con LPS ni con IGF-1.

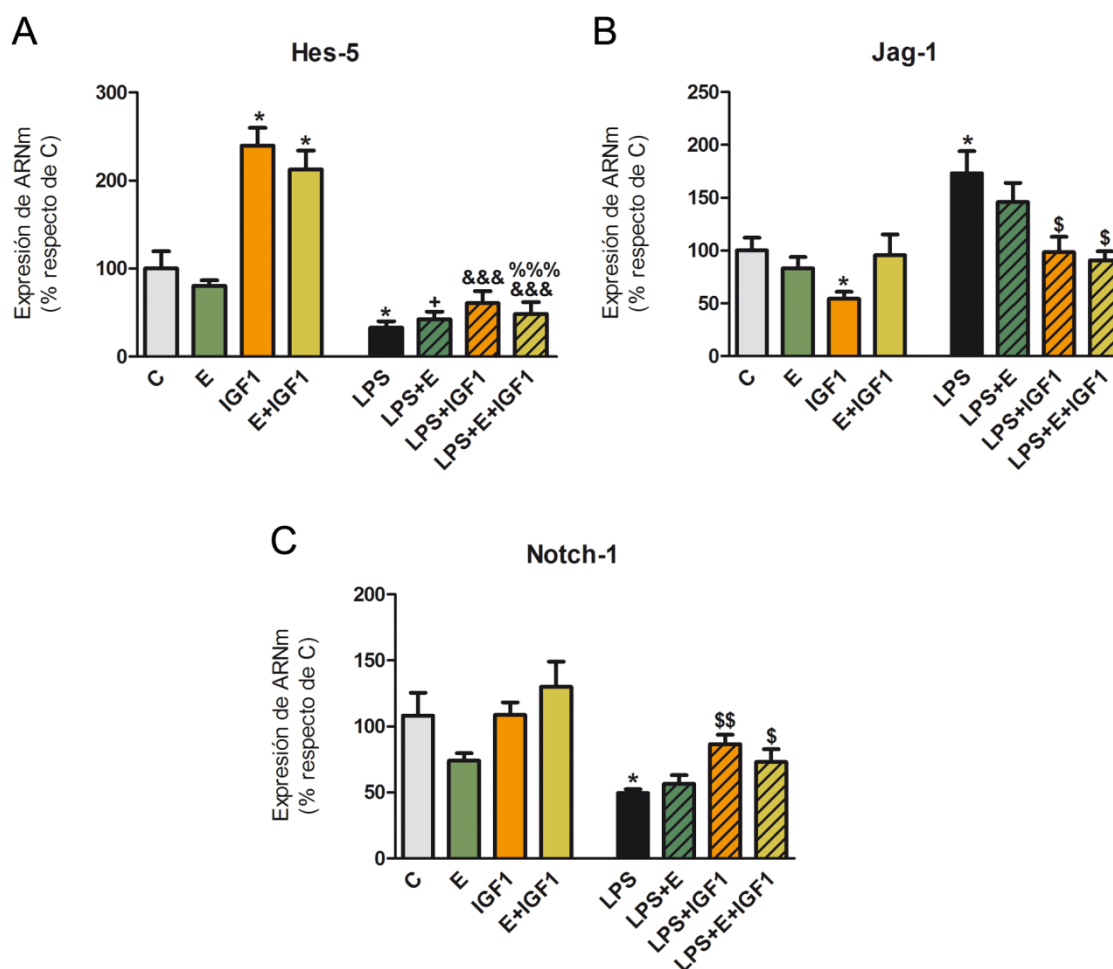


Figura 30. Efecto del doble tratamiento con estradiol e IGF-1 sobre la ruta de Notch en astrocitos corticales, en ausencia o presencia de LPS. *, +, diferencias significativas ($P < 0,05$) respecto de C y E, respectivamente. &&&, diferencias significativas ($P < 0,005$) respecto de IGF-1. %%%, diferencia significativa ($P < 0,005$) respecto de E+IGF-1. \$, \$\$, diferencias significativas ($P < 0,05$ y $P < 0,01$) respecto de LPS. N=10.

En los astrocitos hipotalámicos los tratamientos con IGF-1 en presencia y ausencia de LPS ejercieron efectos similares a los observados en los astrocitos corticales (Figura 31). En condiciones basales el IGF-1 incrementó significativamente la expresión de ARNm de Hes-5 y disminuyó la de Jag-1, tal y como sucedía en astrocitos corticales. Además, el IGF-1 también revirtió los efectos que el LPS había inducido en la expresión de ARNm de Hes-1, Notch-1 y Jag-1.

La Figura 32 muestra los niveles de expresión de ARNm de los genes de la ruta de Notch en astrocitos hipotalámicos tratados con E, IGF-1 y LPS en sus distintas combinaciones. De nuevo observamos una respuesta muy similar a la de los astrocitos

corticales, ya que el 17 β -estradiol no moduló significativamente ninguno de los genes analizados, y que tampoco mostró una interacción significativa con IGF-1 ni con LPS.

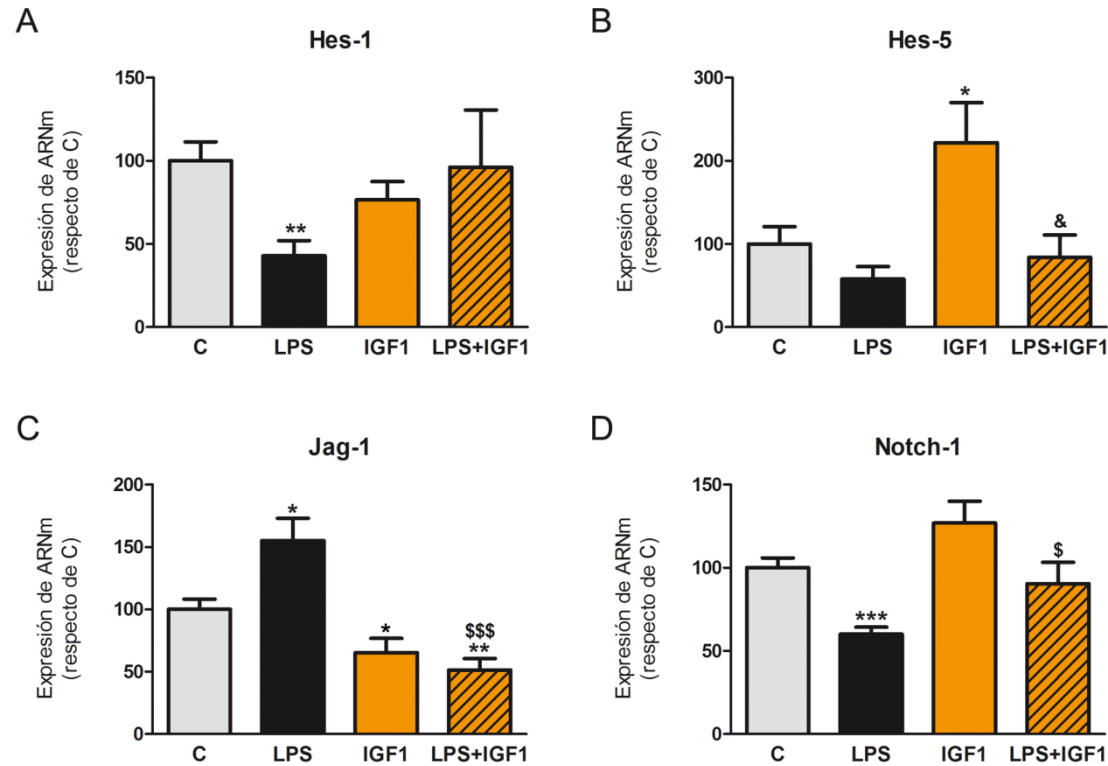


Figura 31. Efecto del IGF-1 sobre la ruta de Notch en astrocitos hipotalámicos, en ausencia o presencia de LPS. *, **, ***, diferencias significativas ($P<0,05$; $P<0,01$ y $P<0,005$) respecto del control. \$, \$\$\$, diferencias significativas ($P<0,05$ y $P<0,005$) respecto de LPS. &, diferencia significativa ($P<0,05$) respecto de IGF-1. N=6.

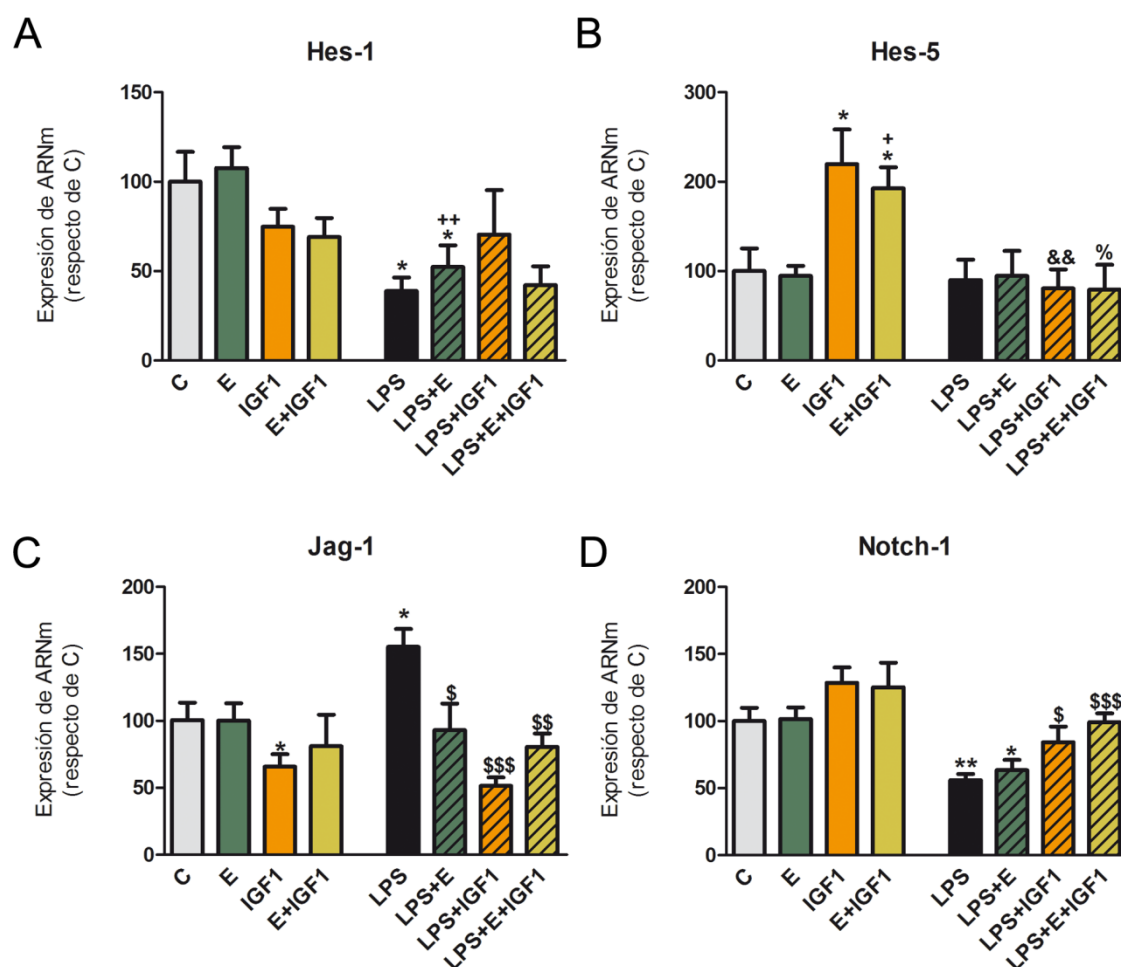


Figura 32. Efecto del doble tratamiento con estradiol e IGF-1 sobre la ruta de Notch en astrocitos hipotálamicos, en ausencia o presencia de LPS. *, **, diferencias significativas ($P < 0,05$; $P < 0,01$) respecto de C.+, ++, diferencias significativas ($P < 0,05$; $P < 0,01$) respecto de E. &&, diferencias significativas ($P < 0,01$) respecto de IGF-1. %, diferencia significativa ($P < 0,05$) respecto de E+IGF-1. \$, \$\$\$, \$\$\$\$, diferencias significativas ($P < 0,05$; $P < 0,01$ y $P < 0,005$) respecto de LPS. N=6.

3. REGULACIÓN DE LA RUTA DE NOTCH POR IGF-1

IGF-1 fue la única molécula neuroprotectora, entre todas las estudiadas, con capacidad de modular la ruta de señalización de Notch y de revertir los efectos del LPS en astrocitos corticales *in vitro*. Por ello, quisimos profundizar en los mecanismos de acción que permitían la regulación de la ruta por parte de este factor de crecimiento en astrocitos corticales.

En primer lugar se estudió si el IGF-1 activaba la ruta de Notch mediante su mecanismo canónico, que consiste en el corte del receptor Notch-1, liberación de su fragmento intracelular, y su translocación nuclear para activar la transcripción de los genes diana. El tratamiento durante 24 h con IGF-1 aumentó significativamente la

cantidad de fragmento intracelular del receptor Notch (NICD) detectable mediante Western Blot (Figura 33 A), junto con un aumento significativo en la transcripción de Hes-5 detectado mediante RT-qPCR (Figura 33 B). La inhibición del complejo enzimático γ -secretasa (responsable de la escisión del receptor Notch) con DAPT, bloqueó los efectos que el IGF-1 ejercía sobre ambos parámetros. Por lo que el IGF-1 favorece la activación canónica de la ruta de Notch.

El tratamiento con LPS disminuyó significativamente la transcripción de Hes-5, como ya se había mostrado previamente; sin embargo, este efecto no vino acompañado de una disminución detectable en la cantidad de NICD. El doble tratamiento (IGF-1 y LPS) disminuyó significativamente la transcripción de Hes-5 con respecto del tratamiento sencillo con IGF-1, llevándola a niveles control. La expresión proteica de NICD en el doble tratamiento también era menor que en el grupo IGF-1, aunque continuaban muy por encima del grupo control (Figura 33). Todo ello sugiere que el efecto que el LPS ejerce sobre la expresión de ARNm de Hes-5 no se debe a que el LPS interfiera con la ruta canónica de Notch.

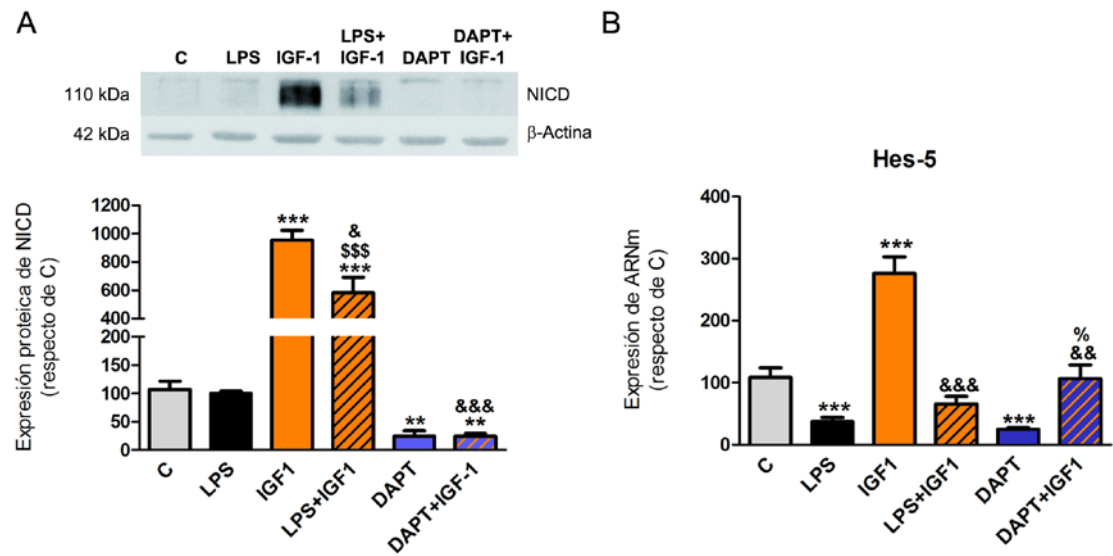


Figura 33. IGF-1 activa la ruta canónica de Notch en astrocitos corticales *in vitro*. Cuantificación proteica del fragmento intracelular del receptor Notch (NICD) (A) y de la expresión de ARNm de Hes-5 (B) tras el tratamiento con IGF-1 durante 24 h en presencia y ausencia de LPS o DAPT. **, ***, diferencias significativas ($P<0,01$ y $P<0,005$) respecto del control. &, &&, &&& diferencias significativas ($P<0,05$; $P<0,01$ y $P>0,005$) respecto de IGF-1. \$\$\$, diferencia significativa ($P<0,005$) respecto de LPS. %, diferencia significativa ($P<0,05$) respecto de DAPT. $N\geq 4$.

La concentración de IGF-1 empleada en estos experimentos es elevada (se encuentra en niveles farmacológicos), por lo que su efecto sobre la activación de la

ruta de Notch podría deberse tanto a la activación del receptor de IGF-1 (IGF1R) como a la activación del receptor de insulina. Por ello se estudió la implicación del IGF1R en los efectos de su ligando sobre la actividad de la ruta de Notch (Figura 34). El antagonista competitivo de IGF-1, NVP, bloqueó parcialmente el aumento en la transcripción de Hes-5 inducido por IGF-1 (Figura 34 A).

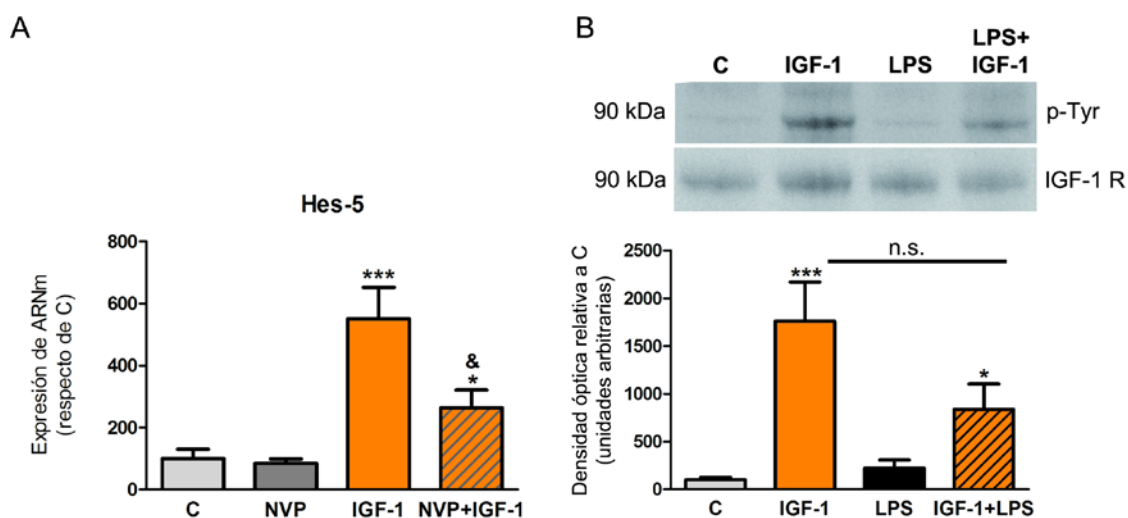


Figura 34. Implicación del receptor de IGF-1 (IGF1R) en la mediación de los efectos del IGF-1 sobre la ruta de Notch. Inmunoprecipitación del IGF1R de astrocitos corticales tratados durante 5 min con IGF-1 y/o LPS (B). Expresión de ARNm de Hes-5 en astrocitos corticales tratados con IGF-1 y/o NVP durante 24 h (A). *, ***, diferencias significativas ($P < 0,05$; $P < 0,005$) respecto de C. &, diferencia significativa ($P < 0,05$) respecto de IGF-1. N=5.

Asimismo se estudió la activación del IGF1R, mediante su inmunoprecipitación y cuantificación del grado de fosforilación en sus residuos de tirosina (Figura 34 B). El tratamiento con IGF-1 indujo un aumento significativo del grado de fosforilación del receptor. En presencia de LPS este efecto del IGF-1 tendió a disminuir, aunque la diferencia encontrada no alcanzó los niveles de significación. Por lo tanto, observamos que el efecto del IGF-1 sobre la transcripción de Hes-5 se debe a su acción específica sobre el IGF1R, y que el LPS tampoco actúa a nivel de dicho receptor para disminuir la activación de la ruta de Notch.

La fosforilación del IGF-1R conduce a la activación de las rutas de señalización de Akt/PI3K y de MAPK. Para determinar cuál de ellas mediaba el efecto de IGF-1 sobre la ruta de Notch se midió la transcripción de Hes-5 en astrocitos tratados con IGF-1 y/o wortmanina (inhibidor de la PI3K) y de U0126 (inhibidor de la MEK) (Figura 35 A y B). El

tratamiento con el inhibidor de MEK, pero no con wortmanina, impidió que el IGF-1 elevase la transcripción de Hes-5; por lo que la ruta de señalización que vincula el IGF1R con Notch es la ruta de las MAPK.

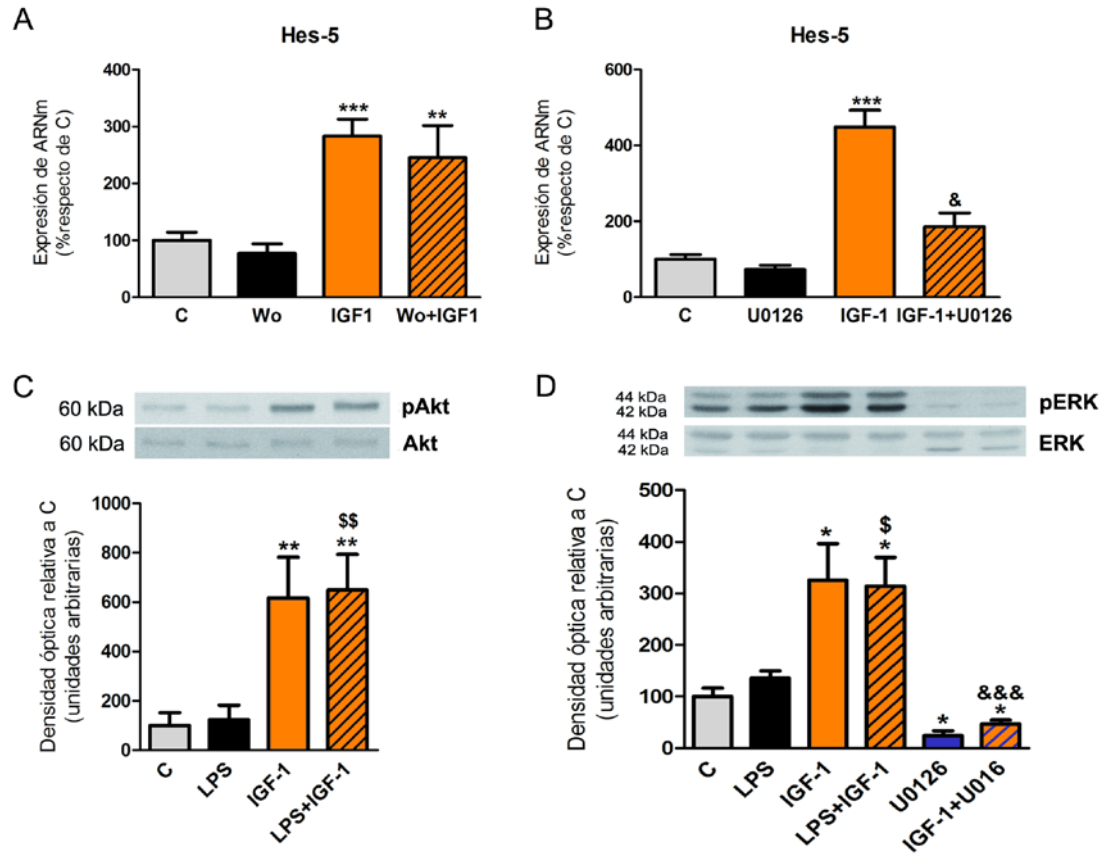


Figura 35. Rutas de señalización implicadas en la regulación de Notch por parte de IGF-1 en astrocitos corticales. Expresión de ARNm de Hes-5 tras los tratamientos con IGF-1 durante 24 h y/o wortmanina (Wo) (A) y U0126 (B). Cuantificación del grado de fosforilación de Akt (C) y ERK-1/2 (D) tras 15 minutos de tratamiento con IGF-1 en células pre-tratadas con LPS o U0126. *, **, ***, diferencias significativas ($P > 0,05$; $P < 0,01$ y $P < 0,005$) respecto de C. &, &&&, diferencias significativas ($P < 0,05$ y $P < 0,005$) respecto de IGF-1. \$, \$\$, diferencias significativas ($P < 0,05$ y $P < 0,01$) respecto de LPS. N=6.

Dado que el tratamiento con LPS bloquea la transcripción de Hes-5 inducida por IGF-1 (Figura 29 A) y que el efecto de IGF-1 es dependiente de la ruta de las MAPK (Figura 35 B), estudiamos si el LPS modulaba las rutas de Akt/PI3K o MAPK. Para ello se estimuló a las células con IGF-1 durante 15 minutos, en ausencia o presencia de LPS (tratamiento previo de 2 h) y se cuantificó el grado de fosforilación de Akt y ERK-1/2 mediante *Western Blot* (Figura 35 C y D). Ambas proteínas experimentaron un aumento de su fosforilación con el tratamiento de IGF-1, pero el LPS no fue capaz de reducirlo en ninguno de los dos casos.

Por lo tanto vimos que el IGF-1, mediante la ruta de las MAPK, inducía la escisión del receptor Notch-1 y aumentaba la transcripción de Hes-5. El tratamiento con LPS bloqueaba el aumento de transcripción de Hes-5 inducido por IGF-1, pero este efecto no se debía a su interferencia con la activación ni con la señalización del IGF1R, y tampoco con el corte del receptor Notch.

4. POSIBLES FUNCIONES DE LA RUTA DE NOTCH DURANTE PROCESOS INFLAMATORIOS EN ASTROCITOS

La ruta de Notch es regulada a la baja, o parcialmente inhibida, en condiciones inflamatorias; tanto *in vivo* como en astrocitos corticales e hipotalámicos *in vitro*. Los siguientes experimentos fueron realizados para estudiar en qué funciones celulares concretas relacionadas con la gliosis podía estar implicada la ruta de Notch.

4.1. REGULACIÓN DE NF- κ B Y PRODUCCIÓN DE CITOQUINAS

El factor de transcripción NF- κ B juega un papel central en la regulación de la producción de citoquinas proinflamatorias, por lo que interacciona con múltiples rutas de señalización. Para estudiar si NF- κ B regula la ruta de Notch, los astrocitos fueron estimulados con LPS en ausencia y en presencia de un inhibidor de la translocación de NF- κ B al núcleo (BAY11) (Figura 36).

En nuestras condiciones experimentales el pre-tratamiento de las células con BAY11 bloqueó parcialmente la transcripción de las citoquinas proinflamatorias IL-6 e IP-10 y completamente la de HIF-1 α , que habían sido inducidas por el LPS (Figura 34 A). La presencia del inhibidor en el medio de cultivo no impidió que el LPS modulase la transcripción de Hes-5 ni Notch-1; sin embargo, sí bloqueó parcialmente el efecto de LPS sobre la expresión de ARNm de Jag-1 (Figura 34 B). Por lo que parece que la regulación de Hes-5 y Notch-1 por LPS no depende de NF- κ B en nuestro modelo, pero sí lo hace la regulación del ligando Jag-1.

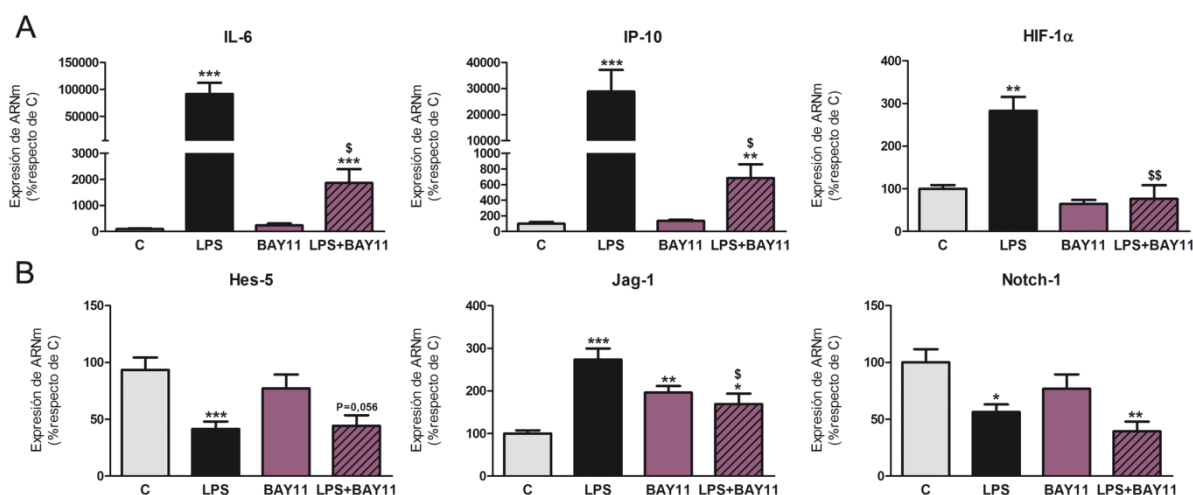


Figura 36. Efecto de la inhibición de NF-κB sobre la expresión de ARNm de citoquinas proinflamatorias y HIF-1α (A), y sobre la expresión de los genes de la ruta de Notch (B) en astrocitos corticales. *, **, ***, diferencias significativas ($P<0,05$; $P>0,01$ y $P<0,005$) con respecto al grupo control. \$, \$\$, diferencias significativas ($P<0,05$ y $P<0,01$) respecto de LPS. N=5.

A continuación se abordó la posible relación entre NF-κB y Notch desde el punto de vista opuesto, planteándonos si Notch podría modular a NF-κB. Dado que el LPS inhibe la ruta de Notch, se forzó una activación constitutiva de la misma mediante la transfección de los astrocitos con un plásmido de sobreexpresión del fragmento intracelular de Notch (NICD) y se evaluó la capacidad de los astrocitos para responder al LPS (Figura 37).

La sobreexpresión de NICD incrementó significativamente la transcripción de Hes-5, como cabía esperar; sin embargo, la expresión de ARNm de Jag-1 permaneció inalterada (Figura 37 A). La activación constitutiva de la ruta de Notch no modificó la expresión de las citoquinas proinflamatorias estudiadas (Figura 37 B). Además, en todos los genes analizados, se observó que los astrocitos mantuvieron su capacidad de responder al LPS independientemente del grado de activación de la ruta de Notch.

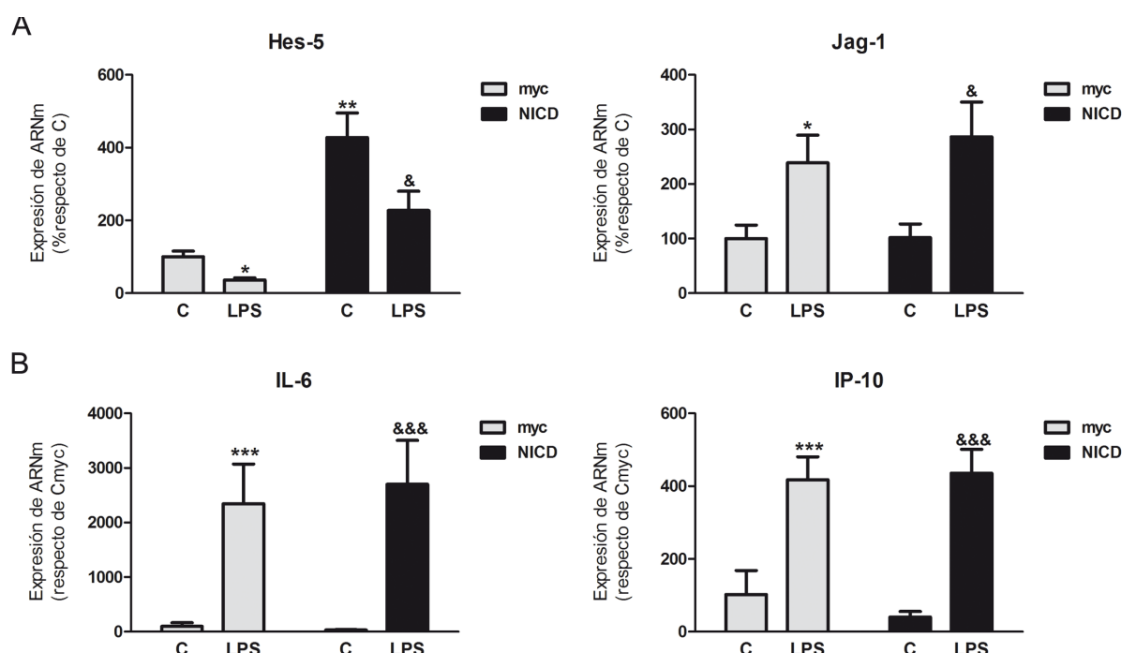


Figura 37. Expresión de ARNm de los genes de la ruta de Notch (A) y de citoquinas proinflamatorias (B), tras la transfección de los astrocitos con un plásmido control (myc) o con uno de sobre-expresión de NICD, su tratamiento con LPS durante 24 h. *, ***, diferencias significativas ($P<0,05$ y $P<0,005$) respecto de C myc. &, &&&, diferencias significativas ($P<0,05$ y $P<0,005$) respecto de C NICD. N=10

A la luz de estos resultados observamos que la activación canónica de Notch no depende de la actividad transcripcional de NF- κ B, y que tampoco regula la síntesis de citoquinas proinflamatorias.

4.2. MORFOLOGÍA CELULAR Y CITOESQUELETO

En nuestro modelo de astrogliosis in vitro se producen modificaciones en la morfología celular y en la expresión de ARNm de filamentos intermedios del citoesqueleto, tal y como muestra la Figura 18. Mediante la sobreexpresión del NICD, estudiamos la posible participación de la ruta de Notch en estas modificaciones que desencadena el tratamiento con LPS. La activación constitutiva de la ruta de Notch no modificó la expresión de ARNm de GFAP ni vimentina. El tratamiento con LPS redujo significativamente la expresión de ARNm de los dos filamentos intermedios, independientemente del grado de activación de la ruta de Notch (Figura 38 A).

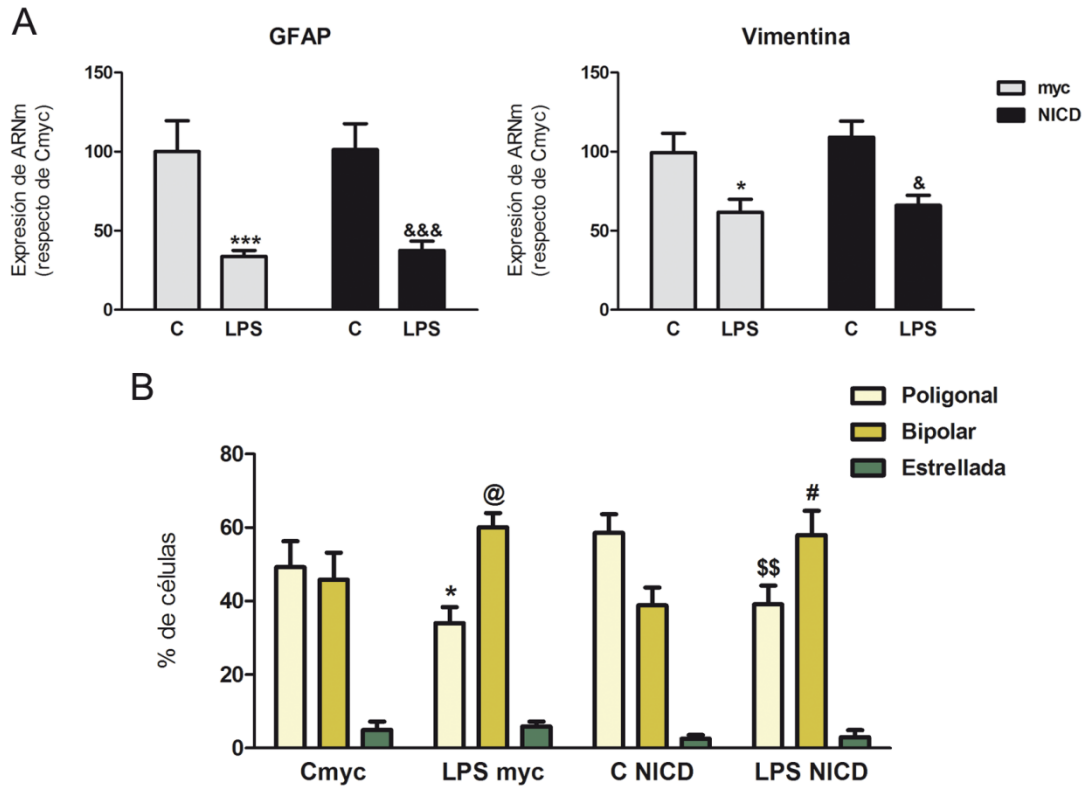


Figura 38. Expresión de ARNm de filamentos intermedios (A) y morfología celular (B) de los astrocitos corticales transfectados con un plásmido control (myc) o de sobreexpresión de NICD, en presencia o ausencia de LPS. *, ***, diferencias significativas ($p < 0,05$ y $P < 0,005$) respecto de C myc. &, &&&, diferencias significativas ($P < 0,05$ y $P < 0,005$) respecto de C NICD. +, diferencia significativa ($P < 0,05$) respecto de "Poligonal C myc". @, diferencia significativa ($P < 0,05$) respecto de "Bipolar C myc". \$\$, diferencia significativa ($P < 0,01$) respecto de "Poligonal C NICD". #, diferencia significativa ($P < 0,05$) respecto de "Bipolar C NICD". N=10 para (A) y N=4 para (B).

En lo concerniente al estudio de la morfología, se observó que la sobreexpresión de NICD no indujo cambios evidentes en la forma de los astrocitos. El tratamiento con LPS generó un aumento del porcentaje de células bipolares, en detrimento de las poligonales; tal y como habíamos demostrado previamente. Pero este efecto del LPS resultó ser independiente del grado de activación de la ruta de Notch (Figura 38 B).

4.3. PROLIFERACIÓN CELULAR

Otro de los fenómenos asociados a la astrogliosis *in vivo* es la proliferación celular. En nuestro modelo *in vitro* empezamos a estudiar la proliferación celular cuantificando el porcentaje de astrocitos que incorporaban BrdU mediante inmunohistoquímica (Figura 39 A). Con esta aproximación experimental observamos que el LPS reducía significativamente la proliferación de los astrocitos; mientras que el

IGF-1 la incrementaba. La administración conjunta de LPS e IGF-1 mostró una tendencia a disminuir la proliferación respecto del IGF-1, llevándola a niveles control.

Debido a que este comportamiento puede considerarse un reflejo de cómo estas moléculas modulan la transcripción de Hes-5, pasamos a estudiar la implicación de la ruta de Notch en la proliferación. Los astrocitos fueron tratados con IGF-1, ya que contribuye a la proliferación celular y que incrementa la transcripción de Hes-5, en presencia o ausencia de DAPT (inhibidor de γ -secretasa). Con el objetivo de estudiar con más precisión esta función, analizamos mediante citometría de flujo las fases del ciclo celular y la incorporación de BrdU (Figura 39). De nuevo se observó que el IGF-1 aumentaba la proliferación de los astrocitos, ya que aumentaba la incorporación de BrdU y el porcentaje de células que se encontraban en fase de síntesis. Sin embargo, parece que este efecto del IGF-1 no estuvo mediado por la ruta canónica de Notch, debido a que el tratamiento con DAPT no modificó ninguno de los parámetros estudiados.

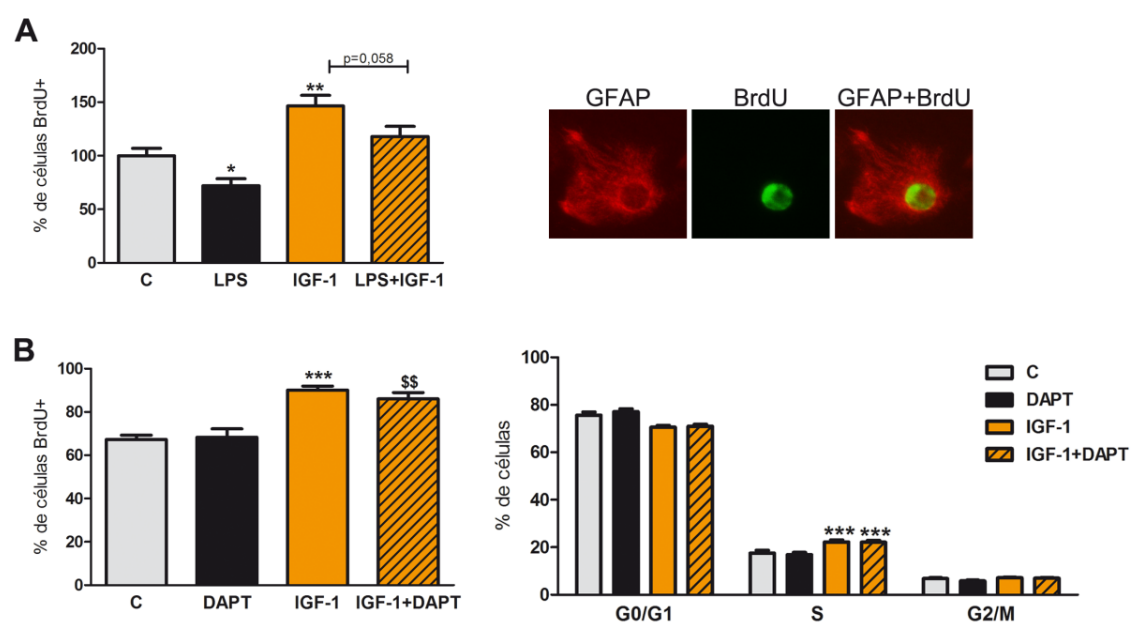


Figura 39. Estudio de la proliferación en astrocitos mediante inmunohistoquímica (A) y citometría de flujo (B). *, **, ***, diferencias significativas ($P<0,05$; $P<0,01$ y $P<0,005$) respecto del grupo control. \$\$, diferencia significativa ($P<0,01$) respecto a DAPT. N=6.

DISCUSIÓN



I. DIFERENCIAS SEXUALES EN NEUROINFLAMACIÓN (*IN VIVO*)

En la primera parte de este estudio evaluamos la respuesta glial ante una lesión penetrante cortical, en ratones de ambos sexos gonadalmente intactos. A pesar de que algunos signos de la reactividad glial persisten semanas después de la lesión cerebral, algunas respuestas como la proliferación celular, o la sobreexpresión de GFAP y vimentina alcanzan sus niveles máximos en la primera semana (Robel et al. 2011). Precisamente por ese motivo, ése fue el momento en el que decidimos estudiar la respuesta de los astrocitos y la microglía frente a la lesión.

En primer lugar se cuantificó la densidad de células inmunorreactivas en el entorno de la lesión y en el hemisferio contralateral, usando anticuerpos contra GFAP como marcador de astrocitos totales, vimentina como marcador de astrocitos reactivos e Iba1 como marcador de microglía y macrófagos. En la zona de la lesión se apreció un aumento significativo en la densidad de estos tres tipos celulares en comparación con el hemisferio contralateral, tal y como ya se había descrito anteriormente (Hampton et al. 2004; Sofroniew 2009; Sofroniew & Vinters 2010); indicando una reactividad glial intensa ante la lesión.

Con el objetivo de analizar más profundamente el comportamiento de las células gliales en la proximidad de la lesión, se incluyó la distancia al borde de la misma como factor de estudio. Se ha descrito que una disminución gradual de la astrogliosis puede considerarse como un signo de transición desde el tejido lesionado al tejido sano que rodea las lesiones focales maduras (Sofroniew 2009; Wanner et al. 2013; Anderson et al. 2014). Por lo tanto, determinar la extensión de la astrogliosis a lo largo del hemisferio lesionado podría darnos una idea acerca de la intensidad del daño infligido por la lesión penetrante. Precisamente, en nuestro modelo observamos una reducción progresiva en la densidad de células inmunopositivas para GFAP y vimentina conforme aumentaba la distancia a la herida, a partir de las 440 μm .

Sin embargo, no se apreciaron diferencias sexuales en el número y reactividad de los astrocitos a la lesión cortical. García-Estada y colaboradores (García-Estrada et al. 1993) estudiaron el efecto de la distancia a la herida y el de las hormonas gonadales sobre la astrogliosis inducida tras una lesión cerebral penetrante. En su trabajo se demostró que ratas gonadectomizadas de ambos sexos presentaban densidades similares de células inmunorreactivas para GFAP, en las distintas distancias a la lesión

estudiadas. Al reemplazar los niveles hormonales en esos animales (con estradiol en las hembras y con testosterona en los machos) se redujo la astrogliosis en torno a la lesión, pero siguieron sin detectar diferencias sexuales.

En lo que respecta a la microglía, encontramos respuestas sexodimórficas ante la lesión penetrante cortical. Los machos mostraron una mayor densidad de células inmunopositivas para Iba1 en el borde de la lesión que las hembras, lo que podría apuntar a una mayor tasa de proliferación o de migración de estas células hacia la zona lesionada, o también a una mayor activación microglial en los machos que en las hembras ante el mismo estímulo. Otra posible explicación a la diferencia sexual en el número de células Iba1 inmunopositivas en el borde de la herida podría ser una diferente tasa de infiltración de células del sistema inmunológico al tejido, dado que Iba1 también se expresa en macrófagos. Este fenómeno depende parcialmente de las moléculas expresadas por los astrocitos que forman la cicatriz glial, como el ligando 2 de quemoquinas con motivos C-C (CCL2). Se sabe que una expresión deficiente de CCL2 en los astrocitos conduce a un reclutamiento deficiente de células del sistema inmunológico, así como a una disminución en la reactividad astrogliar y microglial, en un modelo de encefalomiелitis autoinmune experimental crónica (EAE) (Kim et al. 2014).

Precisamente, las hembras en nuestro estudio presentaron una menor expresión de CCL2 en astrocitos y un menor reclutamiento de células Iba1 inmunopositivas en el borde de la lesión, en comparación con los machos. Resulta interesante el hecho de que tratamientos con estradiol en diferentes modelos experimentales reducen la expresión de CCL2, y generan una reducción significativa de la inmunorreactividad a Iba1 (Giraud et al. 2010; Dang et al. 2011). El presente trabajo se llevó a cabo en animales gonadalmente intactos y los niveles periféricos de hormonas gonadales afectan a la respuesta de la microglía ante el daño cerebral (Barreto et al. 2007, 2014), por lo que estas diferencias observadas entre machos y hembras podrían deberse a sus diferencias hormonales. En un artículo reciente, (Caruso et al. 2013) demostraron que las ratas hembra en fase de diestro muestran niveles más altos de 17β -estradiol y más bajos de progesterona que los machos, en la corteza cerebral. Además, los niveles cerebrales de esteroides sexuales en la zona

dañada no sólo dependen de sus niveles plasmáticos, sino que también dependen de su síntesis local (Compagnone and Mellon 2000). La síntesis local de estradiol y progesterona es regulada tras un daño cerebral en ambos sexos (Caruso et al. 2010; Garcia-Segura et al. 1999; Gatson et al. 2011). Como se ha mencionado en la introducción, el comportamiento de astrocitos y microglía en la zona de la lesión es regulado por múltiples moléculas de señalización que se liberan allí. Por lo tanto, diferencias locales en los niveles de esteroides sexuales presentes en el tejido lesionado podrían contribuir a la generación de diferencias sexuales en la respuesta de las células gliales ante la lesión. En este caso, niveles locales de estradiol más elevados en las hembras que en los machos podrían explicar la menor expresión de CCL2 en los astrocitos de hembras, y en consecuencia atraer a una menor cantidad de células Iba1+ al entorno de la lesión en comparación con los machos.

Una observación importante es que las diferencias sexuales en densidad de células Iba1+ totales se debió al mayor número de células con morfología no reactiva en machos que en hembras. Además, la caracterización molecular de microglía/macrófagos indicó que los machos presentaban una mayor proporción de células inmunopositivas para arginasa-1 (común en las células M2) que las hembras. Resulta interesante que, a pesar de que los machos presentasen un número mayor de microglía/macrófagos que las hembras en el borde de la lesión, también mostraban un mayor número de neuronas en esa área. Dado que machos y hembras presentaban densidades neuronales similares en sus hemisferios contralaterales, podríamos asumir que las diferencias en densidad neuronal alrededor de la lesión se deben a un balance sexodimórfico entre la muerte y la supervivencia neuronal. Es bien conocido el hecho de que las células con fenotipo M2 producen factores neuroprotectores como el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), el factor de crecimiento nervioso (NGF) y el IGF-1 (Glezer et al. 2007; Lai & Todd 2008). Por lo tanto, el hecho de que los machos presentasen una mayor supervivencia neuronal podría explicarse por su mayor tasa de células con expresión de Arg-1, y con morfología no reactiva, en comparación con las hembras.

Con el objetivo de caracterizar más profundamente la respuesta molecular en el área en torno a la lesión, estudiamos la expresión de la proteína neuroprotectora

neuroglobina. De acuerdo con evidencias previas (Hundahl et al. 2010; Lee et al. 2011), la expresión de Ngb apenas era detectable en el neocórtex sano (contralateral), pero su marcaje era evidente en la proximidad a la herida. A pesar de que la expresión de Ngb mostró una extensión similar en ambos sexos, la tasa de colocalización de Ngb en células Iba1+ era dos veces más elevada en machos que en hembras. En general, la expresión de Ngb está limitada a neuronas (Reuss et al. 2002), pero también ha sido detectada en algunas poblaciones de astrocitos reactivos (DellaValle et al. 2010; De Marinis, Acáz-Fonseca et al. 2013), y recientemente también en microglía en un modelo de hemorragia subaracnoidea (Li et al. 2014). No existen evidencias científicas acerca de la posible función de la Ngb en la microglía, pero podría estar implicada en reducir el estrés oxidativo y en la prevención de la muerte celular, considerando sus propiedades antioxidantes (Brunori et al. 2005; Jin et al. 2008; De Marinis, Fiocchetti et al. 2013; Takahashi et al. 2013). Por lo tanto, el hecho de que la microglía de machos expresase neuroglobina más intensamente que la microglía de las hembras, podría estar relacionado con la mayor supervivencia neuronal encontrada en machos.

En resumen, encontramos diferencias sexuales tras una lesión cortical penetrante que se restringieron al tejido más próximo al borde de la herida, entre 0 y 440 μm . En esa región los machos mostraron una mayor densidad de microglía, caracterizada por una mayor proporción de células con morfología no reactiva, una mayor expresión de Arg-1 (característico de células con fenotipo M2) y un aumento en la expresión de Ngb; junto con una mayor supervivencia neuronal, comparados con las hembras. Estos datos sugieren que el entorno molecular generado en el área de la lesión resultó ser más neuroprotector en los machos que en las hembras, y que la microglía podría contribuir a la generación de diferencias sexuales en las consecuencias del daño cerebral. Las causas de ese diferente microambiente molecular en machos y hembras podría deberse a causas hormonales (recordemos que los niveles de progesterona son más elevados en la corteza de machos que de hembras en diestro), o a muchas de las otras causas derivadas de las diferencias genéticas entre los sexos.

El estudio de la evolución de la herida a lo largo del tiempo podría aportar información relevante respecto de las diferencias sexuales que pudieran existir en las

consecuencias funcionales o inflamatorias de la lesión. Sería interesante analizar la maduración y características moleculares de la cicatriz glial en cada sexo, ya que su papel en la contención del daño tisular y en la regeneración axonal pueden ser cruciales para la posterior funcionalidad del tejido. Asimismo, el seguimiento temporal de la expresión de los marcadores moleculares de los fenotipos M1 y M2 podría aportar información acerca de las diferencias sexuales en cuanto a la progresión de la herida y la intensidad del taño tisular causado. Por otra parte, la investigación de la expresión de Ng2 en los distintos tipos celulares también podría ayudar a conocer sus funciones concretas.

II. IMPLICACIÓN DE LA RUTA DE SEÑALIZACIÓN DE NOTCH EN LA NEUROINFLAMACIÓN

Debido a que en nuestro laboratorio habíamos observado diferencias sexuales en la respuesta inflamatoria de los astrocitos corticales *in vitro* (Santos-Galindo et al. 2011; Astiz et al. 2014), decidimos profundizar en las causas moleculares que las regulan.

1. CARACTERIZACIÓN DEL MODELO

En primer lugar se procedió a caracterizar a nivel molecular nuestro modelo, con el objetivo de evaluar si la respuesta de los astrocitos *in vitro* compartía los rasgos fundamentales de la astrogliosis *in vivo*. Las principales características de la astrogliosis reactiva son la sobreexpresión de GFAP, expresión de vimentina, la hipertrofia, el cambio de morfología celular, la liberación de citoquinas proinflamatorias y la expresión de moléculas de daño o estrés celular (Ridet et al. 1997; Sofroniew 2009).

Para generar la respuesta inflamatoria, los astrocitos fueron tratados con lipopolisacárido (LPS), componente de la pared celular de las bacterias Gram negativas. El LPS es reconocido por el receptor TLR-4 (*toll-like receptor 4*), presente en astrocitos y perteneciente a una familia encargada de reconocer los patrones moleculares expresados por un amplio espectro de agentes infecciosos. Tras la unión a su ligando, TLR-4 activa varias rutas de señalización a través de su proteína adaptadora MyD88.

Entre ellas, destaca la activación de NF- κ B, que induce un aumento en la síntesis de citoquinas proinflamatorias (Bowman et al. 2003; Blanco et al. 2005). En nuestro modelo, la estimulación durante 24 h con una dosis no citotóxica del LPS (500 ng/mL) también indujo un incremento significativo de la expresión de ARNm de las tres citoquinas proinflamatorias estudiadas, de acuerdo con la literatura previa (van Neerven et al. 2010; Tarassishin et al. 2014).

En cuanto a marcadores de daño celular, se evaluaron HIF-1 α y Cx-43. HIF-1, es un factor de transcripción heterodimérico que consta de una subunidad estable (β) que se expresa de manera constitutiva, y de una subunidad α sensible a la concentración de oxígeno celular. En condiciones de normoxia la subunidad α es hidroxilada y marcada para su degradación, pero en condiciones de hipoxia se bloquea su hidroxilación, por lo que se acumula en la célula y activa la transcripción de sus genes diana. No obstante HIF-1 α también puede ser activado en normoxia por citoquinas proinflamatorias (Hellwig-Bürgel et al. 1999), sugiriendo que juega un papel importante en la inflamación. En el SNC, HIF-1 α responde a la neuroinflamación aguda *in vivo* (de Lemos et al. 2013), y sus niveles celulares aumentan en astrocitos *in vitro* expuestos al LPS (Gessi et al. 2013). Por lo que el incremento en la expresión de ARNm de HIF-1 α en respuesta al LPS que ocurre en nuestro modelo concuerda con estos trabajos previos. Por su parte, la Cx-43 es una de las proteínas que forman las uniones comunicantes (*gap junctions*) de los astrocitos, que permiten el paso de iones y mensajeros secundarios entre células vecinas. Estas uniones son muy dinámicas, y en diversos modelos de lesión o patologías del SNC se ha observado una alteración en la expresión de Cx-43 (Theriault et al. 1997; Brand-Schieber et al. 2005; Chew et al. 2010). En astrocitos de rata *in vitro* el tratamiento con LPS induce la degradación de Cx-43 (Liao et al. 2013); a pesar de que en nuestro modelo evaluamos su transcripción en vez de sus niveles proteicos, la tendencia a disminuir la cantidad de Cx-43 en los astrocitos como respuesta al LPS es la misma.

En contra de lo que ocurre *in vivo*, no hubo un incremento en la expresión proteica de GFAP tras el tratamiento con LPS durante 24 h en nuestro modelo; y además sus niveles de expresión de ARNm disminuyeron significativamente respecto del control. La expresión de ARNm de vimentina disminuyó significativamente en

hembras tras el tratamiento con LPS, también al contrario de lo que sucede *in vivo*. Apenas hay antecedentes bibliográficos en los que se evalúe la cantidad de GFAP *in vitro* tras estimulación con LPS; pero parece que los efectos observados son dependientes de la concentración empleada del LPS. Por ejemplo, en un trabajo reciente (Zhao et al. 2013) demostraron un aumento en la expresión proteica de GFAP con LPS 1 µg/mL, pero (Tarassishin et al. 2014) no observaron cambios con una dosis de 100 ng/mL. Además, el hecho de que los astrocitos en nuestro modelo estuvieran en condiciones de confluencia total podría afectar a la expresión de estos filamentos intermedios. De hecho, en experimentos previos de nuestro laboratorio, la misma dosis de LPS indujo un incremento de la expresión de vimentina tras 5 h de tratamiento en astrocitos primarios sembrados en menor densidad (De Marinis, Acáz-Fonseca et al. 2013).

El tratamiento con LPS indujo un cambio morfológico en los astrocitos, coincidente con el proceso de “estelación” que se había observado en otros modelos *in vitro*. El cambio morfológico que experimentan los astrocitos *in vivo* no se puede comparar con este proceso de estelación *in vitro*, ya que las morfologías iniciales (o en situación de reposo) son muy diferentes en ambos sistemas. No obstante, los mecanismos que regulan la reorganización del citoesqueleto de actina en ambos procesos seguramente sean similares. La estelación es inducida por diversas drogas *in vitro* que modulan la ATPasa (Rho) o su quinasa efectora ROCK (Racchetti et al. 2012). Entre estas moléculas que inician la estelación *in vitro* encontramos algunas implicadas en fenómenos de inflamación o patogenicidad, como IL-1β (John et al. 2004) o pneumolisina (PSY, producida por *Streptococcus pneumoniae*) (Förtsch et al. 2011).

Con toda esta información, podemos afirmar que nuestro modelo de estimulación de astrocitos *in vitro* con LPS indujo una respuesta inflamatoria parecida, pero no idéntica a la astrogliosis *in vivo*. Sin embargo, bajo estas condiciones experimentales no se apreciaron diferencias sexuales en ninguno de los parámetros analizados relacionados con la inflamación. Este resultado es opuesto a lo observado en trabajos previos de nuestro laboratorio (Santos-Galindo et al. 2011; Astiz et al. 2014), donde los astrocitos derivados de machos presentaban una respuesta inflamatoria más intensa que los derivados de hembras. La discrepancia entre dichos

modelos y el presentado aquí puede radicar en el tiempo de tratamiento. Las diferentes sensibilidades (o los distintos tiempos de respuesta) que puedan presentar los sexos ante un estímulo hace que se aprecien diferencias sexuales a corto plazo, pero que las respuestas se igualen cuando el estímulo permanece durante un tiempo más prolongado en el medio de cultivo.

2. ESTUDIO DE LA RUTA DE NOTCH EN LA NEUROINFLAMACIÓN

En primer lugar estudiamos el curso temporal de expresión de ARNm de los dos efectores de la ruta que más se expresan en el SNC, Hes-1 y Hes-5, del receptor Notch-1 y del ligando Jag-1 en astrocitos corticales derivados de ambos sexos. El tratamiento con LPS ejerció un efecto progresivo sobre la expresión de Hes-5 y Jag-1 a partir de las 14 h, mientras que Notch-1 sólo cambió con el tratamiento de 24 h. La transcripción de Hes-1 no se vio alterada por el LPS en ninguno de los tiempos estudiados. No observamos ninguna diferencia sexual en el comportamiento de estos genes, como tampoco había sucedido en los parámetros relacionados con la inflamación. Debido a esto, no podemos evaluar si la ausencia de efecto del sexo sobre Notch se debe a la ausencia de efecto del sexo sobre la inflamación en nuestro modelo; o si simplemente esta ruta no es sensible al sexo en ninguna circunstancia. Por lo tanto, no podemos asegurar que Notch medie ninguna de las diferencias sexuales de la astrogliosis reactiva con nuestro modelo.

Debido a que todos los genes respondían al tratamiento con LPS durante 24 h y a que esa respuesta no presentaba apenas variabilidad, se decidió escoger este tiempo de tratamiento para los siguientes experimentos; unificando también los resultados de células derivadas de ambos sexos. Tras el tratamiento durante 24 h con LPS en las células obtenidas de la corteza cerebral se observó una reducción en la actividad de la ruta de Notch, explicada por la disminución en la expresión de ARNm de Hes-5 y Notch-1. Este efecto inhibitorio del LPS ya se había observado en macrófagos, en los que la endotoxina reducía la transcripción de Hes-1 y Hes-5 mediada por NICD, al inducir la nitrosilación del NICD y reducir su capacidad de unión a CBF1 (Kim et al. 2008). El incremento de la expresión del ligando Jag-1 también contribuye a la

inhibición en *cis* de la ruta de Notch (Kim et al. 2011); además, aunque la transcripción del ligando aumente, si disminuye la cantidad de receptor al que puede unirse no podrá ejercer una activación en *trans* sobre otros astrocitos. En algunas líneas celulares se ha demostrado que LPS y NF- κ B son capaces de aumentar la transcripción y traducción de Jag-1 (Bash et al. 1999; Amsen et al. 2004), incrementando su capacidad de generar una activación en *trans* cuando son cocultivadas junto a células que expresan el receptor Notch. Dado que nuestros cultivos estaban enriquecidos en un solo tipo celular, esa activación en *trans* no pudo ser estudiada en nuestro modelo, pero puede que tenga alguna finalidad en los astrocitos *in vivo*.

En los astrocitos hipotalámicos observamos el mismo comportamiento que en los corticales ante la estimulación con LPS, con la diferencia de que el efector modulado en esta región cerebral es Hes-1 en vez de Hes-5. Las distintas respuestas en cada región ante un mismo estímulo, pueden interpretarse como una nueva fuente de regulación de la ruta de Notch y refuerzan la teoría de la dependencia del contexto que muestra esta ruta. La preferencia del efector regulado en cada región cerebral podría explicarse por la distinta dotación de correguladores de CBF1 que presenten los astrocitos en su núcleo, así como por la distinta dotación de enzimas para la remodelación de la cromatina presentes en los astrocitos de cada región cerebral. Ambas posibilidades harían que el repertorio de genes susceptibles de ser modulados sea dependiente del tipo celular (Schweisguth 2004; Ables et al. 2011; Wang 2011; Wang et al. 2014).

Esta idea de las respuestas dependientes del contexto celular o molecular se reafirma con el análisis de la ruta de Notch en la corteza cerebral de ratones macho siete días después de sufrir una lesión penetrante. A pesar de que estas muestras incluyen la expresión génica combinada de todos los tipos celulares de la corteza cerebral, la respuesta global de Notch al daño tisular es muy similar a la emitida por los astrocitos corticales estimulados con LPS. De nuevo observamos una inhibición de la ruta de Notch, con regulación exclusiva del efector Hes-5; mientras que la expresión de Hes-1 y sus dianas Ngn-3 y NeuroD no se modificó. La transcripción del receptor Notch-1 mostró una tendencia a aumentar en el entorno a la lesión, al contrario de lo observado en astrocitos. A pesar de que los niveles de expresión de ARNm y proteína

no tienen por qué modificarse en el mismo sentido, el hecho de que la transcripción de Hes-5 disminuya sin que se modifique la del receptor Notch-1 podría sugerir que la transcripción de este efector podría depender de otra isoforma de receptor Notch, o de mecanismos no canónicos. Sin embargo, la literatura al respecto de la regulación de Hes-5 coincide en que esta segunda opción no es la más factible; mientras que Hes-1 puede transcribirse por mecanismos no dependientes de NICD o de CBF1, Hes-5 no (de la Pompa et al. 1997; Barrantes et al. 1999; Donoviel et al. 1999; Handler et al. 2000).

La inhibición de la ruta Notch por la lesión se manifiesta también por el incremento en la expresión de Jag-1, tal y como sucedía en los astrocitos *in vitro*, así como por el aumento en la expresión de Dlk-1. Dlk-1 es un homólogo de Dll; su estructura proteica es muy similar, pero DLK-1 carece del dominio DSL que caracteriza a los ligandos canónicos de Notch (Baladrón et al. 2005), por lo que se considera como un ligando no canónico de Notch. Además se sabe que DLK-1 se une específicamente a Notch-1 compitiendo con los ligandos canónicos, e impidiendo su activación (Sánchez-Solana et al. 2011). Dlk-1 juega un papel importante en la neurogénesis embrionaria y adulta (en la zona subventricular); aunque no se expresa en astrocitos ni neuronas de la corteza cerebral adulta en condiciones fisiológicas (Ferrón et al. 2011; Meister et al. 2013), todavía no se conoce su función ante un daño tisular. En un modelo de esclerosis múltiple se ha demostrado que los astrocitos hipertróficos sobreexpresan Jag-1 en torno a las lesiones, induciendo la activación de Notch-1/Hes-5 en los precursores de oligodendrocitos adyacentes e impidiendo su diferenciación. La sobreexpresión de Jag-1 en ese modelo experimental parece responder específicamente a TGF- β , citoquina sintetizada en las fases de recuperación de la enfermedad (Issazadeh et al. 1998). Sin embargo, la expresión del ligando Dll-1 es menos abundante en estas células y parece insensible a los factores proinflamatorios (John et al. 2002; Elyaman et al. 2007). Estos hechos podrían indicar que Jag-1 juega un papel importante en la modulación de la astrogliosis, así como en la coordinación de la respuesta multicelular requerida ante estímulos lesivos.

3. REGULACIÓN DE LA RUTA DE NOTCH POR AGENTES ANTI-INFLAMATORIOS Y NEUROPROTECTORES

Una vez comprobado en nuestro modelo que la ruta de Notch está inhibida en condiciones inflamatorias, nos planteamos la posibilidad de que distintos compuestos endocrinos ejercieran sus efectos anti-inflamatorios mediante el restablecimiento o modulación de la señalización de Notch.

El 17 β -estradiol ha sido la hormona más estudiada en cuanto a su interacción con Notch, debido a que ambas rutas de señalización comparten ciertos procesos celulares. De hecho, su interacción se ha evidenciado en funciones como la proliferación, la apoptosis y la migración en células de cáncer de mama (Rizzo et al. 2008; Hao et al. 2010; Hu et al. 2011; Pupo et al. 2014), o en la angiogénesis (Soares et al. 2004; Caliceti et al. 2013). Los mecanismos moleculares que median dicha comunicación son múltiples y dependen mucho de los tipos celulares en los que se hayan estudiado. Sin embargo, en los astrocitos corticales *in vitro* no observamos ninguna modulación de la ruta de Notch por parte del 17 β -estradiol, ni en condiciones inflamatorias ni en condiciones basales. Esta ausencia de regulación no se debió al tiempo de estimulación con estradiol, ni a un posible enmascaramiento de su efecto por la producción endógena de la hormona en los cultivos.

Debido a que los astrocitos muestran algunos comportamientos dependientes de la región cerebral de la que proceden (Kipp et al. 2007; Araújo et al. 2008), en nuestro estudio también se evaluó el efecto del 17 β -estradiol sobre la ruta de Notch en astrocitos hipotalámicos. El tratamiento con estradiol en estas células eliminó la sobreexpresión de Jag-1 inducida por el LPS, pero mantuvo la reducción en la transcripción de Hes-1. Este hecho indica que la represión transcripcional de Hes-1 no depende exclusivamente de la inhibición en *cis* de Jag-1, y que el LPS reprime la ruta de Notch al menos mediante dos mecanismos independientes. El mecanismo por el que el LPS controla la transcripción de Jag-1 probablemente sea no canónico, por lo que dependerá de su interacción con otras rutas de señalización.

Las diferencias encontradas entre los astrocitos corticales e hipotalámicos en esta respuesta al estradiol, por lo tanto, podrían radicar en la distinta susceptibilidad

de las rutas de señalización responsables de la regulación de Jag-1 a ser moduladas por el estradiol. En caso de que el efecto de la hormona sobre la transcripción de Jag-1 se deba a un mecanismo de acción genómico, las diferencias regionales encontradas también podrían deberse a la distinta dotación de cofactores de los receptores de estrógenos presentes en los astrocitos de cada región cerebral. Precisamente, el tratamiento con SERMs de los astrocitos corticales revirtió la sobreexpresión de Jag-1 que había inducido el LPS, manteniéndose la represión transcripcional del efector Hes-5. Así, las diferencias en el reclutamiento de cofactores entre el estradiol y los SERMs podrían explicar los diferentes efectos observados sobre la transcripción de Jag-1.

La siguiente hormona con capacidad antiinflamatoria que evaluamos fue la progesterona. En distintos tejidos se ha demostrado una regulación de la ruta de Notch por parte de la progesterona, como en el endometrio (Afshar et al. 2012) o en los ovarios (Guo et al. 2012; Accialini et al. 2014; Murta et al. 2014). Sin embargo, su aplicación en los astrocitos corticales no alteró la expresión de ARNm de los genes de la ruta de Notch en condiciones basales, ni revirtió los efectos causados por el LPS.

Sin embargo, el IGF-1 sí fue capaz de modificar la actividad de la ruta de Notch, y de revertir los efectos del LPS. El efecto del IGF-1 aplicado en condiciones basales resultó idéntico en astrocitos corticales e hipotalámicos: incrementó la transcripción de Hes-5, disminuyó la de Jag-1, pero no modificó la expresión de ARNm de Notch-1 ni de Hes-1. De nuevo observamos que la ruta de Notch responde con especificidad de efector ante un estímulo, y que en esta ocasión es independiente de la región cerebral estudiada. Además, en condiciones inflamatorias, el IGF-1 revirtió el efecto del LPS sobre la transcripción de Jag-1, Notch-1, Hes-5 (en corteza) y Hes-1 (en hipotálamo); sugiriendo un mecanismo de acción distinto al del estradiol y SERMs, capaces de revertir solamente el efecto del LPS sobre Jag-1. Es más, el tratamiento combinado de IGF-1 y 17 β -estradiol no ejerció ninguna modulación distinta a la del IGF-1 en solitario, ni en los astrocitos corticales ni en los hipotalámicos. Dado que la interacción entre la señalización de ambas hormonas sucede a nivel de PI3K (Mendez et al. 2003), podríamos descartar la participación de PI3K/Akt como mediadores de la acción del IGF-1 en este sistema.

No existen demasiados antecedentes bibliográficos sobre la modulación de la ruta de Notch por parte del IGF-1, por lo que decidimos profundizar en los mecanismos de acción implicados en este efecto y en su interacción con LPS. Así, demostramos que el IGF-1 favorece la escisión del receptor Notch-1 por parte del complejo enzimático γ -secretasa, lo que conduce al aumento en la transcripción de Hes-5 en los astrocitos corticales. El LPS inhibe muy levemente el corte de Notch-1 inducido por la hormona, por lo que no parece que ése sea su principal mecanismo de acción para reducir la transcripción de Hes-5. Además comprobamos que la acción del IGF-1 sobre la transcripción de Hes-5 transcurre a través de su receptor específico (IGF1R), activando la ruta de las MAPK, y de manera independiente de la ruta Akt/PI3K (tal y como sugerían los datos de los dobles tratamientos con estradiol). El LPS no afecta a la activación del IGF1R ni de las rutas de señalización dependientes de él, por lo que cabría pensar que interacciona con el IGF-1 modulando la ruta de Notch a un nivel transcripcional.

Podríamos considerar que la activación de la ruta de Notch por parte del IGF-1 sucede mediante su vía canónica porque la transcripción de Hes-5 es dependiente del corte del receptor y liberación del NICD, pero en realidad no sabemos si la señal comienza con la unión específica entre un ligando canónico y Notch-1. Conocer el vínculo entre la ruta de las MAPK y la actividad γ -secretasa podría ayudarnos a desenmascarar este proceso. Por ejemplo, el IGF-1 podría estar induciendo la síntesis de alguno de los ligandos canónicos de Notch y así favoreciendo la activación canónica de la ruta; a pesar de que la transcripción de Jag-1 disminuye tras el tratamiento con IGF-1 y de que la sobreexpresión de ligandos puede generar inhibición de la ruta en *cis*. No hay evidencias previas de que el IGF-1 induzca la síntesis de ligandos canónicos de Notch; no obstante, en algunos trabajos se empieza a vislumbrar una relación entre la expresión de Dlk-1 (ligando no canónico) y la señalización del IGF-1, aunque no se conocen los detalles de su interacción (Zhang et al. 2003; Charalambous et al. 2014). Otra posibilidad sería que el IGF-1 interfiriese con el tráfico del receptor Notch, favoreciendo su escisión por el complejo γ -secretasa sin necesidad de la unión ligando-receptor (mecanismo descrito en (Hori et al. 2004; Yamamoto et al. 2010)). En *C. elegans* se ha demostrado que la endocitosis y el tráfico de LIN-12 (ortólogo de Notch-

1 de mamíferos) están regulados por la ruta de las MAPK (Shaye and Greenwald 2005); en *Drosophila* la glicosilación de Notch depende de Foxo, factor de transcripción regulado por la insulina y por el IGF-1 (Yang et al. 2013).

4. FUNCIONALIDAD DE LA RUTA DE NOTCH DURANTE LA ASTROGLIOSIS REACTIVA

En nuestro modelo de inflamación *in vitro* la ruta de Notch está inhibida en los astrocitos corticales e hipotalámicos; fenómeno revertido por el IGF-1 y sólo parcialmente por los compuestos estrogénicos. Por ello, el siguiente paso consistió en estudiar las funciones concretas de la ruta en los astrocitos reactivos.

En primer lugar se estudió la posible relación entre la ruta de Notch y NF- κ B, el factor central en la regulación de la inflamación. Ambas rutas se regulan mutuamente, mediante mecanismos moleculares dependientes del contexto y del tipo celular estudiado (Osipo et al. 2008). En nuestras condiciones experimentales el inhibidor de la ruta canónica de NF- κ B, BAY-11, redujo la transcripción de las citoquinas proinflamatorias y de HIF-1 α inducidas por el LPS, tal y como se había descrito previamente (Nomura 2001; Frede et al. 2005, 2006; Rius et al. 2008; Tsapournioti et al. 2013). Además, la presencia de BAY-11 en el medio de cultivo redujo la sobreexpresión de Jag-1 inducida por el LPS, reforzando la idea de que este efecto observado en astrocitos es dependiente de NF- κ B (Bash et al. 1999; Amsen et al. 2004). Sin embargo, BAY-11 no alteró el efecto del LPS sobre la transcripción de Hes-5 ni sobre la de Notch-1, por lo que la represión de estos dos genes depende de un mecanismo de acción distinto. Esto podría explicar por qué los SERMs y el estradiol (en células hipotalámicas), cuyos efectos anti-inflamatorios cursan a través de la inhibición de NF- κ B (Cerciat et al. 2010), sólo eran capaces de revertir el efecto del LPS sobre Jag-1, y no sobre Hes o Notch.

En una línea celular de macrófagos, se demostró que la sobreexpresión de NICD inducía la transcripción de la citoquina proinflamatoria IL-6, mediante su interacción con NF- κ B (Wongchana and Palaga 2012). Sin embargo, en nuestro modelo experimental la sobreexpresión de NICD no es suficiente para aumentar la síntesis de citoquinas proinflamatorias, ni tampoco altera la respuesta de IL-6 o IP-10 al LPS en los

astrocitos. Por lo que la represión transcripcional de Hes-5 causada por el LPS no está mediada por NF- κ B, ni está relacionada con la regulación de la producción de citoquinas en astrocitos corticales. Es más, el LPS es capaz de disminuir la expresión de ARNm de Hes-5 incluso en las células transfectadas con NICD, indicando que actúa directamente regulando su transcripción, mediante un mecanismo de acción que todavía desconocemos. La transcripción de Jag-1 tampoco se vio modificada por la sobreexpresión de NICD/Hes-5, por lo que una vez más comprobamos que ambos fenómenos inducidos por el LPS son independientes uno del otro, y que el LPS inhibe la ruta de Notch mediante, al menos, dos mecanismos de acción distintos.

A continuación se estudió la posible implicación de la ruta de Notch en los cambios que el LPS ejerce sobre el citoesqueleto de los astrocitos corticales. La sobreexpresión de NICD/Hes-5 no alteró la expresión de GFAP ni vimentina, ni tampoco modificó la morfología de los astrocitos. Dado que el LPS pudo mantener sus efectos sobre la transcripción de estos genes y sobre la morfología celular a pesar de la sobreexpresión de NICD, parece que Hes-5 no media dichos cambios celulares inducidos por el LPS.

La última función relacionada con la astrogliosis en la que se estudió la participación de la ruta de Notch fue la proliferación celular. El tratamiento con IGF-1 incrementó la incorporación de BrdU y el porcentaje de astrocitos que se encontraban en fase de síntesis, tal y como se había descrito para otros tipos celulares (Mairet-Coello et al. 2009; Kouroupi et al. 2010). Dado que en nuestro modelo el LPS inhibe parcialmente tanto la proliferación de los astrocitos como la transcripción de Hes-5 inducidos por el IGF-1, quisimos comprobar si Hes-5 era responsable del efecto proliferativo del IGF-1. Sin embargo, al tratar las células con IGF-1 en presencia del inhibidor de γ -secretasa, DAPT, no se previno el aumento en la proliferación celular. La ruta de Notch controla la proliferación de células madre embrionarias, como parte de la toma de decisiones cruciales durante su diferenciación (Das et al. 2010); y también controla la progresión del ciclo celular en células tumorales y el crecimiento de los tumores (Ronchini and Capobianco 2001; Capaccione and Pine 2013); no obstante en los astrocitos corticales *in vitro* NICD y/o Hes-5 no median estas funciones. Dado que el IGF-1 y el LPS también ejercieron efectos opuestos sobre la expresión de ARNm del

ligando Jag-1, cabría la posibilidad de que la ruta de Notch controlara la proliferación celular mediante mecanismos no canónicos, a través de Jag-1.

La Figura 40 resume los resultados sobre la regulación de la ruta de Notch en nuestro modelo *in vitro* por parte del LPS, del IGF-1 y de los compuestos estrogénicos.

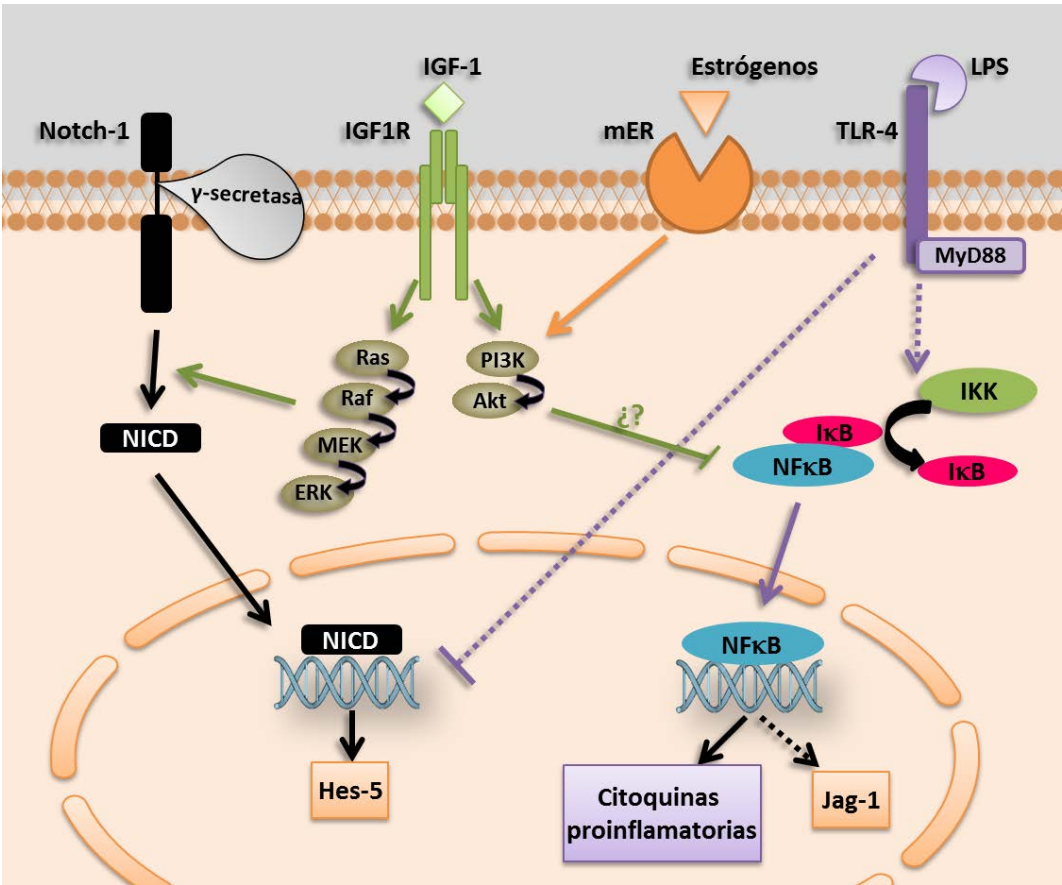


Figura 40. Esquema resumen de la regulación de la ruta de Notch en astrocitos corticales, por parte del LPS, del IGF-1 y de los compuestos estrogénicos. Las líneas continuas representan los mecanismos directos de activación (punta de flecha) o inhibición (extremo plano) de distintas moléculas, mientras que las líneas discontinuas representan los mecanismos indirectos.

CONCLUSIONES



1. No se detectaron diferencias sexuales en el número o reactividad de los astrocitos, pero sí en su perfil molecular. Los astrocitos de hembras mostraron una menor expresión de CCL2 que en machos, lo que podría explicar la diferencia en el número total de células Iba1+ en la proximidad a la lesión, ya que dicha proteína contribuye al reclutamiento de células del sistema inmunológico y a la reactividad glial.
2. Existen diferencias sexuales en la reactividad glial ante la lesión cortical penetrante, que se localizan en el borde de la herida. En esa región, los machos presentan mayor cantidad de células de microglía, con un carácter menos pro-inflamatorio que en las hembras; acompañado de una mayor supervivencia neuronal en los machos. Estos datos sugieren que la microglía podría contribuir a la generación de diferencias sexuales en las consecuencias del daño cerebral.
3. La ruta de señalización de Notch está regulada a la baja ante un estímulo lesivo en el sistema nervioso central, tanto *in vivo* como *in vitro*. En astrocitos *in vitro*, el estímulo pro-inflamatorio LPS genera una represión de la transcripción del efector Hes (específico para cada región cerebral estudiada) y un aumento de la expresión de ARNm del ligando Jag-1.
4. La represión transcripcional de Hes-5 generada por el LPS en astrocitos corticales es independiente de NF- κ B, no está relacionada con la producción de citoquinas, con los cambios en los filamentos intermedios del citoesqueleto, ni con los cambios en la morfología o proliferación celular inducidos por el LPS. La modulación de la expresión de Hes-5 por parte del LPS no sucede a nivel del receptor Notch-1, sino que el LPS parece controlar directamente la transcripción del efector. Sin embargo, la inducción de la transcripción de Jag-1 generada por el LPS sí sucede a través de NF- κ B, y es independiente de los niveles de NICD y Hes-5 presentes en la célula.
5. En astrocitos corticales, ni el 17 β -estradiol ni la progesterona fueron capaces de revertir los efectos del LPS sobre la ruta de Notch. Sin embargo, todos los SERMs

estudiados revirtieron el efecto del LPS sobre Jag-1. En astrocitos hipotalámicos el 17β -estradiol también revirtió la sobreexpresión de ARNm de Jag-1. En ningún caso estos compuestos fueron capaces de regular Hes, por lo que la reversión parcial del efecto del LPS posiblemente sucediera a través de la inhibición de NF- κ B.

6. Por el contrario, el IGF-1 fue capaz de revertir todos los efectos generados por el LPS sobre la ruta de Notch en astrocitos corticales e hipotalámicos. Además, en condiciones basales el IGF-1 regula la activación canónica de la ruta de Notch, mediante la activación de su receptor específico y a través de la ruta de las MAPK.

BIBLIOGRAFÍA



- Ables JL, Breunig JJ, Eisch AJ, Rakic P. 2011. Not(ch) just development: Notch signalling in the adult brain. *Nat Rev Neurosci.* 12:269–283.
- Acáz-Fonseca E, Sanchez-Gonzalez R, Azcoitia I, Arevalo MA, Garcia-Segura LM. 2014. Role of astrocytes in the neuroprotective actions of 17 β -estradiol and selective estrogen receptor modulators. *Mol Cell Endocrinol.* 389:48–57.
- Accialini P, Hernández SF, Bas D, Pazos MC, Irusta G, Abramovich D, Tesone M. 2014. A link between Notch and progesterone maintains the functionality of the rat corpus luteum. *Reproduction.* 149:1–10.
- Afshar Y, Miele L, Fazleabas AT. 2012. Notch1 is regulated by chorionic gonadotropin and progesterone in endometrial stromal cells and modulates decidualization in primates. *Endocrinology.* 153:2884–2896.
- Alejandro-Gomez M, Garcia-Segura LM, Gonzalez-Burgos I. 2007. Administration of an inhibitor of estrogen biosynthesis facilitates working memory acquisition in male rats. *Neurosci Res.* 58:272–277.
- Allenspach EJ, Maillard I, Aster JC, Pear WS. 2002. Notch signaling in cancer. *Cancer Biol Ther.* 1:466–476.
- Amsen D, Blander JM, Lee GR, Tanigaki K, Honjo T, Flavell RA. 2004. Instruction of distinct CD4 T helper cell fates by different notch ligands on antigen-presenting cells. *Cell.* 117:515–526.
- Andersen K, Launer L, Dewey M, Letenneur L, Ott A, Copeland J, Dartigues J, Kragh-Sorensen P, Baldereschi M, Brayne C, Lobo A, Martinez-Lage J, Stijnen T, Hofman A. 1999. Gender differences in the incidence of AD and vascular dementia. *Neurology.* 53: 1992-1997.
- Andersen P, Uosaki H, Shenje LT, Kwon C. 2012. Non-canonical Notch signaling: Emerging role and mechanism. *Trends Cell Biol.* 22: 257-265.
- Anderson M A, Ao Y, Sofroniew M V. 2014. Heterogeneity of reactive astrocytes. *Neurosci Lett.* 565: 23-29.
- Anderson MF, Aberg MA, Nilsson M, Eriksson PS. 2002. Insulin-like growth factor-I and neurogenesis in the adult mammalian brain. *Brain Res Dev Brain Res.* 134:115-122.
- Araújo GW, Beyer C, Arnold S. 2008. Oestrogen influences on mitochondrial gene expression and respiratory chain activity in cortical and mesencephalic astrocytes. *J Neuroendocrinol.* 20:930–941.
- Arevalo MA, Diz-Chaves Y, Santos-Galindo M, Bellini MJ, Garcia-Segura LM. 2012. Selective oestrogen receptor modulators decrease the inflammatory response of glial cells. *J Neuroendocrinol.* 24:183-190.
- Arevalo MA, Azcoitia I, Garcia-Segura LM. 2015. The neuroprotective actions of oestradiol and oestrogen receptors. *Nat Rev Neurosci.* 16: 17-29.

- Arevalo MA, Ruiz-Palmero I, Simon-Areces J, Acaz-Fonseca E, Azcoitia I, Garcia-Segura LM. 2011. Estradiol meets notch signaling in developing neurons. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2:21.
- Arzate-Mejía RG, Valle-García D, Recillas-Targa F. 2011. Signaling epigenetics: novel insights on cell signaling and epigenetic regulation. *IUBMB Life*. 63:881-895.
- Astiz M, Acaz-Fonseca E, Garcia-Segura LM. 2014. Sex differences and effects of estrogenic compounds on the expression of inflammatory molecules by astrocytes exposed to the insecticide dimethoate. *Neurotox Res*. 25:271-285.
- Azcoitia I, Sierra A, Garcia-Segura LM. 1999. Neuroprotective effects of estradiol in the adult rat hippocampus: interaction with insulin-like growth factor-I signalling. *J Neurosci Res*. 58:815-822.
- Bach MA, Shen-Orr Z, Lowe, Jr. WL, Roberts CT, LeRoith D. 1991. Insulin-like growth factor I mRNA levels are developmentally regulated in specific regions of the rat brain. *Mol Brain Res*. 10:43-48.
- Baladrón V, Ruiz-Hidalgo MJ, Nueda ML, Díaz-Guerra MJM, García-Ramírez JJ, Bonvini E, Gubina E, Laborda J. 2005. dlk acts as a negative regulator of Notch1 activation through interactions with specific EGF-like repeats. *Exp Cell Res*. 303:343-359.
- Barrantes IB, Elia AJ, Wunsch K, Hrabe de Angelis MH, Mak TW, Rossant J, Conlon RA, Gossler A, de la Pompa JL. 1999. Interaction between Notch signalling and Lunatic fringe during somite boundary formation in the mouse. *Curr Biol*. 9:470-480.
- Barreto G, Veiga S, Azcoitia I, Garcia-Segura LM, Garcia-Ovejero D. 2007. Testosterone decreases reactive astroglia and reactive microglia after brain injury in male rats: role of its metabolites, oestradiol and dihydrotestosterone. *Eur J Neurosci*. 25:3039-3046.
- Barreto GE, Santos-Galindo M, Garcia-Segura LM. 2014. Selective estrogen receptor modulators regulate reactive microglia after penetrating brain injury. *Front Aging Neurosci*. 6:132.
- Barron AM, Pike CJ. 2012. Sex hormones, aging, and Alzheimer's disease. *Front Biosci (Elite Ed)*. 4:976-997.
- Bash J, Zong WX, Banga S, Rivera A, Ballard DW, Ron Y, Gélinas C. 1999. Rel/NF-kappaB can trigger the Notch signaling pathway by inducing the expression of Jagged1, a ligand for Notch receptors. *EMBO J*. 18:2803-2811.
- Baulieu EE. 1997. Neurosteroids: of the nervous system, by the nervous system, for the nervous system. *Recent Prog Horm Res*. 52:1-32.
- Bellini MJ, Hereñú CB, Goya RG, Garcia-Segura LM. 2011. Insulin-like growth factor-I gene delivery to astrocytes reduces their inflammatory response to lipopolysaccharide. *J Neuroinflammation*. 8:21.

- Bender RA, Zhou L, Wilkars W, Fester L, Lanowski J-S, Paysen D, König A, Rune GM. 2010. Roles of 17 β -estradiol involve regulation of reelin expression and synaptogenesis in the dentate gyrus. *Cereb Cortex*. 20:2985-2995.
- Blanco AM, Vallés SL, Pascual M, Guerri C. 2005. Involvement of TLR4/type I IL-1 receptor signaling in the induction of inflammatory mediators and cell death induced by ethanol in cultured astrocytes. *J Immunol*. 175:6893-6899.
- Bondy CA, Lee WH. 1993. Patterns of insulin-like growth factor and IGF receptor gene expression in the brain. Functional implications. *Ann N Y Acad Sci*. 692:33-43.
- Borggreffe T, Liefke R. 2012. Fine-tuning of the intracellular canonical Notch signaling pathway. *Cell Cycle*. 11:264-276.
- Bowers JM, Waddell J, McCarthy MM. 2010. A developmental sex difference in hippocampal neurogenesis is mediated by endogenous oestradiol. *Biol Sex Differ*. 1:8.
- Bowman CC, Rasley A, Tranguch SL, Marriott I. 2003. Cultured astrocytes express toll-like receptors for bacterial products. *Glia*. 43:281-291.
- Brand-Schieber E, Werner P, Iacobas DA, Iacobas S, Beelitz M, Lowery SL, Spray DC, Scemes E. 2005. Connexin43, the major gap junction protein of astrocytes, is down-regulated in inflamed white matter in an animal model of multiple sclerosis. *J Neurosci Res*. 80:798-808.
- Braun A, Dang J, Johann S, Beyer C, Kipp M. 2009. Selective regulation of growth factor expression in cultured cortical astrocytes by neuro-pathological toxins. *Neurochem Int*. 55:610-618.
- Breunig JJ, Silbereis J, Vaccarino FM, Sestan N, Rakic P. 2007. Notch regulates cell fate and dendrite morphology of newborn neurons in the postnatal dentate gyrus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104:20558-20563.
- Brinton LA, Felix AS. 2014. Menopausal hormone therapy and risk of endometrial cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 142:83-89.
- Brunori M, Giuffrè A, Nienhaus K, Nienhaus GU, Scandurra FM, Vallone B. 2005. Neuroglobin, nitric oxide, and oxygen: functional pathways and conformational changes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102:8483-8488.
- Buffo A, Rolando C, Ceruti S. 2010. Astrocytes in the damaged brain: molecular and cellular insights into their reactive response and healing potential. *Biochem Pharmacol*. 79:77-89.
- Burda JE, Sofroniew M V. 2014. Reactive gliosis and the multicellular response to CNS damage and disease. *Neuron*. 81:229-248.
- Cai Z, Fan L-W, Lin S, Pang Y, Rhodes PG. 2011. Intranasal administration of insulin-like growth factor-1 protects against lipopolysaccharide-induced injury in the developing rat brain. *Neuroscience*. 194:195-207.

- Caliceti C, Aquila G, Pannella M, Morelli MB, Fortini C, Pinton P, Bonora M, Hrelia S, Pannuti A, Miele L, Rizzo P, Ferrari R. 2013. 17 β -estradiol enhances signalling mediated by VEGF-A-delta-like ligand 4-notch1 axis in human endothelial cells. *PLoS One*. 8:e71440.
- Cao Q, Kaur C, Wu C-Y, Lu J, Ling E. 2011. Nuclear factor-kappa β regulates Notch signaling in production of proinflammatory cytokines and nitric oxide in murine BV-2 microglial cells. *Neuroscience*. 192:140-154.
- Cao Q, Li P, Lu J, Dheen ST, Kaur C, Ling E. 2010. Nuclear factor-kB/p65 responds to changes in the Notch signaling pathway in murine BV-2 cells and in amoeboid microglia in postnatal rats treated with the γ -secretase complex blocker DAPT. *J Neurosci Res*. 88:2701-2714.
- Capaccione KM, Pine SR. 2013. The Notch signaling pathway as a mediator of tumor survival. *Carcinogenesis*. 34:1420-1430.
- Cardona-Gómez GP, DonCarlos L, Garcia-Segura LM. 2000. Insulin-like growth factor 1 receptors and estrogen receptors colocalize in female rat brain. *Neuroscience*. 99:751-760.
- Cardona-Gomez GP, Mendez P, Garcia-Segura LM. 2002. Synergistic interaction of estradiol and insulin-like growth factor-I in the activation of PI3K/Akt signaling in the adult rat hypothalamus. *Brain Res Mol Brain Res*. 107:80-88.
- Caruso D, D'Intino G, Giatti S, Maschi O, Pesaresi M, Calabrese D, Garcia-Segura L-M, Calza L, Melcangi RC. 2010. Sex-dimorphic changes in neuroactive steroid levels after chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurochem*. 114:921-932.
- Caruso D, Pesaresi M, Abbiati F, Calabrese D, Giatti S, Garcia-Segura LM, Melcangi RC. 2013. Comparison of plasma and cerebrospinal fluid levels of neuroactive steroids with their brain, spinal cord and peripheral nerve levels in male and female rats. *Psychoneuroendocrinology*. 38:2278-2290.
- Cerciat M, Unkila M, Garcia-Segura LM, Arevalo MA. 2010. Selective estrogen receptor modulators decrease the production of interleukin-6 and interferon-gamma-inducible protein-10 by astrocytes exposed to inflammatory challenge in vitro. *Glia*. 58:93-102.
- Chakraborty S, Kaushik DK, Gupta M, Basu A. 2010. Inflammasome signaling at the heart of central nervous system pathology. *J Neurosci Res*. 88:1615-1631.
- Charalambous M, da Rocha ST, Hernandez A, Ferguson-Smith AC. 2014. Perturbations to the IGF1 growth pathway and adult energy homeostasis following disruption of mouse chromosome 12 imprinting. *Acta Physiol (Oxf)*. 210:174-187.
- Chesik D, Wilczak N, De Keyser J. 2007. The insulin-like growth factor system in multiple sclerosis. *Int Rev Neurobiol*. 79:203-226.
- Chew SSL, Johnson CS, Green CR, Danesh-Meyer H V. 2010. Role of connexin43 in central nervous system injury. *Exp Neurol*. 225:250-261.

- Ciriza I, Carrero P, Azcoitia I, Lundeen SG, Garcia-Segura LM. 2004. Selective estrogen receptor modulators protect hippocampal neurons from kainic acid excitotoxicity: differences with the effect of estradiol. *J Neurobiol.* 61:209-221.
- Compagnone NA, Mellon SH. 2000. Neurosteroids: biosynthesis and function of these novel neuromodulators. *Front Neuroendocrinol.* 21:1-56.
- Cornil CA, Ball GF, Balthazart J. 2012. Rapid control of male typical behaviors by brain-derived estrogens. *Front Neuroendocrinol.* 33:425-446.
- Cosimo Melcangi R, Garcia-Segura LM. 2010. Sex-specific therapeutic strategies based on neuroactive steroids: In search for innovative tools for neuroprotection. *Horm Behav.* 57:2-11.
- Costa RM, Honjo T, Silva AJ. 2003. Learning and memory deficits in Notch mutant mice. *Curr Biol.* 13:1348-1354.
- Cregg JM, DePaul MA, Filous AR, Lang BT, Tran A, Silver J. 2014. Functional regeneration beyond the glial scar. *Exp Neurol.* 253:197-207.
- Curry CL, Reed LL, Nickoloff BJ, Miele L, Foreman KE. 2006. Notch-independent regulation of Hes-1 expression by c-Jun N-terminal kinase signaling in human endothelial cells. *Lab Invest.* 86:842-852.
- D'Ercole AJ, Ye P, Calikoglu AS, Gutierrez-Ospina G. 1996. The role of the insulin-like growth factors in the central nervous system. *Mol Neurobiol.* 13:227-255.
- D'Souza B, Miyamoto A, Weinmaster G. 2008. The many facets of Notch ligands. *Oncogene.* 27:5148-5167.
- Dahlhaus M, Hermans JM, Van Woerden LH, Saiepour MH, Nakazawa K, Mansvelder HD, Heimel JA, Levelt CN. 2008. Notch1 signaling in pyramidal neurons regulates synaptic connectivity and experience-dependent modifications of acuity in the visual cortex. *J Neurosci.* 28:10794-10802.
- Dalla C, Antoniou K, Papadopoulou-Daifoti Z, Balthazart J, Bakker J. 2004. Oestrogen-deficient female aromatase knockout (ArKO) mice exhibit "depressive-like" symptomatology. *Eur J Neurosci.* 20:217-228.
- Dang J, Mitkari B, Kipp M, Beyer C. 2011. Gonadal steroids prevent cell damage and stimulate behavioral recovery after transient middle cerebral artery occlusion in male and female rats. *Brain Behav Immun.* 25:715-726.
- Dart DA, Waxman J, Aboagye EO, Bevan CL. 2013. Visualising androgen receptor activity in male and female mice. *PLoS One.* 8:e71694.
- Das D, Lanner F, Main H, Andersson ER, Bergmann O, Sahlgren C, Heldring N, Hermanson O, Hansson EM, Lendahl U. 2010. Notch induces cyclin-D1-dependent proliferation during a specific temporal window of neural differentiation in ES cells. *Dev Biol.* 348:153-166.

- Davis RL, Turner DL. 2001. Vertebrate hairy and Enhancer of split related proteins: transcriptional repressors regulating cellular differentiation and embryonic patterning. *Oncogene*. 20:8342-8357.
- De la Pompa JL, Wakeham A, Correia KM, Samper E, Brown S, Aguilera RJ, Nakano T, Honjo T, Mak TW, Rossant J, Conlon RA. 1997. Conservation of the Notch signalling pathway in mammalian neurogenesis. *Development*. 124:1139-1148.
- De Lemos ML, de la Torre AV, Petrov D, Brox S, Folch J, Pallàs M, Lazarowski A, Beas-Zarate C, Auladell C, Camins A. 2013. Evaluation of hypoxia inducible factor expression in inflammatory and neurodegenerative brain models. *Int J Biochem Cell Biol*. 45:1377-1388.
- De Marinis E, Acaz-Fonseca E, Arevalo MA, Ascenzi P, Fiocchetti M, Marino M, Garcia-Segura LM. 2013. 17 β -Oestradiol anti-inflammatory effects in primary astrocytes require oestrogen receptor β -mediated neuroglobin up-regulation. *J Neuroendocrinol*. 25:260-270.
- De Marinis E, Ascenzi P, Pellegrini M, Galluzzo P, Bulzomi P, Arevalo MA, Garcia-Segura LM, Marino M. 2010. 17 β -estradiol-a new modulator of neuroglobin levels in neurons: role in neuroprotection against H₂O₂-induced toxicity. *Neurosignals*. 18:223-235.
- De Marinis E, Fiocchetti M, Acconcia F, Ascenzi P, Marino M. 2013. Neuroglobin upregulation induced by 17 β -estradiol sequesters cytochrome c in the mitochondria preventing H₂O₂-induced apoptosis of neuroblastoma cells. *Cell Death Dis*. 4:e508.
- Del Álamo D, Rouault H, Schweisguth F. 2011. Mechanism and significance of cis-inhibition in notch signalling. *Curr Biol*. 21 (1):R40-7.
- DellaValle B, Hempel C, Kurtzhals JAL, Penkowa M. 2010. In vivo expression of neuroglobin in reactive astrocytes during neuropathology in murine models of traumatic brain injury, cerebral malaria, and autoimmune encephalitis. *Glia*. 58:1220-1227.
- Desai M, Li T, Ross MG. 2011. Fetal hypothalamic neuroprogenitor cell culture: Preferential differentiation paths induced by leptin and insulin. *Endocrinology*. 152:3192-3201.
- Diez H, Fischer A, Winkler A, Hu C-J, Hatzopoulos AK, Breier G, Gessler M. 2007. Hypoxia-mediated activation of Dll4-Notch-Hey2 signaling in endothelial progenitor cells and adoption of arterial cell fate. *Exp Cell Res*. 313:1-9.
- Diz-Chaves Y, Pernía O, Carrero P, Garcia-Segura LM. 2012. Prenatal stress causes alterations in the morphology of microglia and the inflammatory response of the hippocampus of adult female mice. *J Neuroinflammation*. 9:71.
- Donoviel DB, Hadjantonakis AK, Ikeda M, Zheng H, Hyslop PS, Bernstein A. 1999. Mice lacking both presenilin genes exhibit early embryonic patterning defects. *Genes Dev*. 13:2801-2810.
- Dooley MA, Hogan SL. 2003. Environmental epidemiology and risk factors for autoimmune disease. *Curr Opin Rheumatol*. 15:99-103.

- Elyaman W, Bradshaw EM, Wang Y, Oukka M, Kivisakk P, Chiba S, Yagita H, Khoury SJ. 2007. Jagged1 and Delta1 Differentially Regulate the Outcome of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J Immunol.* 179:5990-5998.
- Fawcett JW, Asher RA. 1999. The glial scar and central nervous system repair. *Brain Res Bull.* 49:377-391.
- Fernandez AM, Fernandez S, Carrero P, Garcia-Garcia M, Torres-Aleman I. 2007. Calcineurin in reactive astrocytes plays a key role in the interplay between proinflammatory and anti-inflammatory signals. *J Neurosci.* 27:8745-8756.
- Fernandez AM, Torres-Alemán I. 2012. The many faces of insulin-like peptide signalling in the brain. *Nat Rev Neurosci.* 13:225-239.
- Ferrón SR, Charalambous M, Radford E, McEwen K, Wildner H, Hind E, Morante-Redolat JM, Laborda J, Guillemot F, Bauer SR, Fariñas I, Ferguson-Smith AC. 2011. Postnatal loss of Dlk1 imprinting in stem cells and niche astrocytes regulates neurogenesis. *Nature.* 475:381-385.
- Fischer A, Gessler M. 2007. Delta-Notch-and then? Protein interactions and proposed modes of repression by Hes and Hey bHLH factors. *Nucleic Acids Res.* 35:4583-4596.
- Fiúza U-M, Arias AM. 2007. Cell and molecular biology of Notch. *J Endocrinol.* 194:459-474.
- Fleming RJ, Hori K, Sen A, Filloramo G V, Langer JM, Obar R a, Artavanis-Tsakonas S, Maharaj-Best AC. 2013. An extracellular region of Serrate is essential for ligand-induced cis-inhibition of Notch signaling. *Development.* 140:2039-2049.
- Folkerd E, Dowsett M. 2013. Sex hormones and breast cancer risk and prognosis. *Breast.* 22 Suppl 2:S38-S43.
- Förtsch C, Hupp S, Ma J, Mitchell TJ, Maier E, Benz R, Iliev AI. 2011. Changes in astrocyte shape induced by sublytic concentrations of the cholesterol-dependent cytolysin pneumolysin still require pore-forming capacity. *Toxins (Basel).* 3:43-62.
- Franco Rodríguez NE, Dueñas Jiménez JM, De la Torre Valdovinos B, López Ruiz JR, Hernández Hernández L, Dueñas Jiménez SH. 2013. Tamoxifen favoured the rat sensorial cortex regeneration after a penetrating brain injury. *Brain Res Bull.* 98:64-75.
- Fratiglioni L, Viitanen M, von Strauss E, Tontodonati V, Herlitz A, Winblad B. 1997. Very old women at highest risk of dementia and Alzheimer's disease: incidence data from the Kungsholmen Project, Stockholm. *Neurology.* 48:132-138.
- Frede S, Freitag P, Otto T, Heilmaier C, Fandrey J. 2005. The proinflammatory cytokine interleukin 1beta and hypoxia cooperatively induce the expression of adrenomedullin in ovarian carcinoma cells through hypoxia inducible factor 1 activation. *Cancer Res.* 65:4690-4697.
- Frede S, Stockmann C, Freitag P, Fandrey J. 2006. Bacterial lipopolysaccharide induces HIF-1 activation in human monocytes via p44/42 MAPK and NF-kappaB. *Biochem J.* 396:517-527.

- Fu W, Jhamandas JH. 2014. Role of astrocytic glycolytic metabolism in Alzheimer's disease pathogenesis. *Biogerontology*. 15:579-586.
- Gamboa C, Ortega A. 2002. Insulin-like growth factor-1 increases activity and surface levels of the GLAST subtype of glutamate transporter. *Neurochem Int*. 40:397-403.
- Gao Z, Zhu Q, Zhang Y, Zhao Y, Cai L, Shields CB, Cai J. 2013. Reciprocal modulation between microglia and astrocyte in reactive gliosis following the CNS injury. *Mol Neurobiol*. 48:690-701.
- Garcia-Estrada J, Del Rio JA, Luquin S, Soriano E, Garcia-Segura LM. 1993. Gonadal hormones down-regulate reactive gliosis and astrocyte proliferation after a penetrating brain injury. *Brain Res*. 628:271-278.
- Garcia-Estrada J, Garcia-Segura LM, Torres-Aleman I. 1992. Expression of insulin-like growth factor I by astrocytes in response to injury. *Brain Res*. 592:343-347.
- Garcia-Segura LM, Cañas B, Parducz A, Rougon G, Theodosis D, Naftolin F, Torres-Aleman I. 1995. Estradiol promotion of changes in the morphology of astroglia growing in culture depends on the expression of polysialic acid of neural membranes. *Glia*. 13:209-216.
- García-Segura LM, Pérez J, Pons S, Rejas MT, Torres-Alemán I. 1991. Localization of insulin-like growth factor I (IGF-I)-like immunoreactivity in the developing and adult rat brain. *Brain Res*. 560:167-174.
- Garcia-Segura LM, Wozniak a, Azcoitia I, Rodriguez JR, Hutchison RE, Hutchison JB. 1999. Aromatase expression by astrocytes after brain injury: implications for local estrogen formation in brain repair. *Neuroscience*. 89:567-578.
- Gatson JW, Simpkins JW, Yi KD, Idris AH, Minei JP, Wigginton JG. 2011. Aromatase is increased in astrocytes in the presence of elevated pressure. *Endocrinology*. 152:207-213.
- Gazave E, Lapébie P, Richards GS, Brunet F, Ereskovsky AV, Degnan BM, Borchellini C, Vervoort M, Renard E. 2009. Origin and evolution of the Notch signalling pathway: an overview from eukaryotic genomes. *BMC Evol Biol*. 9:249.
- Genis L, Dávila D, Fernandez S, Pozo-Rodríguez A, Martínez-Murillo R, Torres-Aleman I. 2014. Astrocytes require insulin-like growth factor I to protect neurons against oxidative injury. *F1000Research*. 3:28.
- Gessi S, Merighi S, Stefanelli A, Fazzi D, Varani K, Borea PA. 2013. A(1) and A(3) adenosine receptors inhibit LPS-induced hypoxia-inducible factor-1 accumulation in murine astrocytes. *Pharmacol Res*. 76:157-170.
- Ghorbanpoor S, Garcia-Segura LM, Haeri-Rohani A, Khodagholi F, Jorjani M. 2014. Aromatase inhibition exacerbates pain and reactive gliosis in the dorsal horn of the spinal cord of female rats caused by spinothalamic tract injury. *Endocrinology*. 55(11):4341-55
- Giatti S, Boraso M, Melcangi RC, Viviani B. 2012. Neuroactive steroids, their metabolites, and neuroinflammation. *J Mol Endocrinol*. 49:R125-R134.

- Gillies GE, McArthur S. 2010. Estrogen actions in the brain and the basis for differential action in men and women: a case for sex-specific medicines. *Pharmacol Rev.* 62:155-198.
- Giraud SN, Caron CM, Pham-Dinh D, Kitabgi P, Nicot AB. 2010. Estradiol inhibits ongoing autoimmune neuroinflammation and NFkappaB-dependent CCL2 expression in reactive astrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107:8416-8421.
- Gleicher N, Barad DH. 2007. Gender as risk factor for autoimmune diseases. *J Autoimmun.* 28:1-6.
- Glezer I, Simard AR, Rivest S. 2007. Neuroprotective role of the innate immune system by microglia. *Neuroscience.* 147:867-883.
- Grandbarbe L, Michelucci A, Heurtaux T, Hemmer K, Morga E, Heuschling P. 2007. Notch signaling modulates the activation of microglial cells. *Glia.* 55:1519-1530.
- Guenoun R, Labombarda F, Gonzalez Deniselle MC, Liere P, De Nicola AF, Schumacher M. 2014. Progesterone and allopregnanolone in the central nervous system: Response to injury and implication for neuroprotection. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 146C:48-61.
- Guo M, Zhang H, Bian F, Li G, Mu X, Wen J, Mao G, Teng Z, Xia G, Zhang M. 2012. P4 down-regulates Jagged2 and Notch1 expression during primordial folliculogenesis. *Front Biosci (Elite Ed).* 4:2731-2744.
- Gustafsson M V., Zheng X, Pereira T, Gradin K, Jin S, Lundkvist J, Ruas JL, Poellinger L, Lendahl U, Bondesson M. 2005. Hypoxia requires Notch signaling to maintain the undifferentiated cell state. *Dev Cell.* 9:617-628.
- Guthrie KM, Nguyen T, Gall CM. 1995. Insulin-like growth factor-1 mRNA is increased in deafferented hippocampus: spatiotemporal correspondence of a trophic event with axon sprouting. *J Comp Neurol.* 352:147-160.
- Habib P, Beyer C. 2015. Regulation of brain microglia by female gonadal steroids. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 146C:3-14
- Hampton DW, Rhodes KE, Zhao C, Franklin RJM, Fawcett JW. 2004. The responses of oligodendrocyte precursor cells, astrocytes and microglia to a cortical stab injury, in the brain. *Neuroscience.* 127:813-820.
- Handler M, Yang X, Shen J. 2000. Presenilin-1 regulates neuronal differentiation during neurogenesis. *Development.* 127:2593-2606.
- Hanisch U-K, Kettenmann H. 2007. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci.* 10:1387-1394.
- Hao L, Rizzo P, Osipo C, Pannuti a, Wyatt D, Cheung LW-K, Sonenshein G, Osborne B a, Miele L. 2010. Notch-1 activates estrogen receptor-alpha-dependent transcription via IKKalpha in breast cancer cells. *Oncogene.* 29:201-213.

- Hatton WJ, von Bartheld CS. 1999. Analysis of cell death in the trochlear nucleus of the chick embryo: calibration of the optical disector counting method reveals systematic bias. *J Comp Neurol.* 409:169-186.
- Hellwig-Bürgel T, Rutkowski K, Metzen E, Fandrey J, Jelkmann W. 1999. Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha stimulate DNA binding of hypoxia-inducible factor-1. *Blood.* 94:1561-1567.
- Hojo M, Ohtsuka T, Hashimoto N, Gradwohl G, Guillemot F, Kageyama R. 2000. Glial cell fate specification modulated by the bHLH gene Hes5 in mouse retina. *Development.* 127:2515-2522.
- Hori K, Fostier M, Ito M, Fuwa TJ, Go MJ, Okano H, Baron M, Matsuno K. 2004. Drosophila deltex mediates suppressor of Hairless-independent and late-endosomal activation of Notch signaling. *Development.* 131:5527-5537.
- Hori K, Sen A, Kirchhausen T, Artavanis-Tsakonas S. 2012. Regulation of ligand-independent Notch signal through intracellular trafficking. *Commun Integr Biol.* 5:374-376.
- Howard C, Reed M. 1998. Unbiased Stereology: Three-Dimensional Measurement in Microscopy. Oxford BIOS Sci Publ.
- Hu X, Leak RK, Shi Y, Suenaga J, Gao Y, Zheng P, Chen J. 2015. Microglial and macrophage polarization-new prospects for brain repair. *Nat Rev Neurol.* 11:56-64.
- Hu Z, Kagan BL, Ariazi EA, Rosenthal DS, Zhang L, Li JV, Huang H, Wu C, Jordan VC, Riegel AT, Wellstein A. 2011. Proteomic analysis of pathways involved in estrogen-induced growth and apoptosis of breast cancer cells. *PLoS One.* 6:e20410.
- Hundahl CA, Allen GC, Hannibal J, Kjaer K, Rehfeld JF, Dewilde S, Nyengaard JR, Kelsen J, Hay-Schmidt A. 2010. Anatomical characterization of cytoglobin and neuroglobin mRNA and protein expression in the mouse brain. *Brain Res.* 1331:58-73.
- Iso T, Sartorelli V, Poizat C, Iezzi S, Wu HY, Chung G, Kedes L, Hamamori Y. 2001. HERP, a novel heterodimer partner of HES/E(spl) in Notch signaling. *Mol Cell Biol.* 21:6080-6089.
- Issazadeh S, Navikas V, Schaub M, Sayegh M, Khoury S. 1998. Kinetics of expression of costimulatory molecules and their ligands in murine relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis in vivo. *J Immunol.* 161:1104-1112.
- Jacobson DL, Gange SJ, Rose NR, Graham NM. 1997. Epidemiology and estimated population burden of selected autoimmune diseases in the United States. *Clin Immunol Immunopathol.* 84:223-243.
- Jin K, Mao XO, Xie L, Khan AA, Greenberg DA. 2008. Neuroglobin protects against nitric oxide toxicity. *Neurosci Lett.* 430:135-137.
- John GR, Chen L, Riviaccio MA, Melendez-Vasquez C V, Hartley A, Brosnan CF. 2004. Interleukin-1beta induces a reactive astroglial phenotype via deactivation of the Rho GTPase-Rock axis. *J Neurosci.* 24:2837-2845.

- John GR, Shankar SL, Shafit-Zagardo B, Massimi A, Lee SC, Raine CS, Brosnan CF. 2002. Multiple sclerosis: re-expression of a developmental pathway that restricts oligodendrocyte maturation. *Nat Med.* 8:1115-1121.
- Johnson EA. 2011. HIF takes it up a notch. *Sci Signal.* 4:pe33.
- Kageyama R, Ohtsuka T, Hatakeyama J, Ohsawa R. 2005. Roles of bHLH genes in neural stem cell differentiation. *Exp Cell Res.* 306:343-348.
- Kamakura S, Oishi K, Yoshimatsu T, Nakafuku M, Masuyama N, Gotoh Y. 2004. Hes binding to STAT3 mediates crosstalk between Notch and JAK-STAT signalling. *Nat Cell Biol.* 6:547-554.
- Kazanis I, Bozas E, Philippidis H, Stylianopoulou F. 2003. Neuroprotective effects of insulin-like growth factor-I (IGF-I) following a penetrating brain injury in rats. *Brain Res.* 991:34-45.
- Kigerl K a, Gensel JC, Ankeny DP, Alexander JK, Donnelly DJ, Popovich PG. 2009. Identification of two distinct macrophage subsets with divergent effects causing either neurotoxicity or regeneration in the injured mouse spinal cord. *J Neurosci.* 29:13435-13444.
- Kim M-Y, Jung J, Mo J-S, Ann E-J, Ahn J-S, Yoon J-H, Park H-S. 2011. The intracellular domain of Jagged-1 interacts with Notch1 intracellular domain and promotes its degradation through Fbw7 E3 ligase. *Exp Cell Res.* 317:2438-2446.
- Kim M-Y, Park J-H, Mo J-S, Ann E-J, Han S-O, Baek S-H, Kim K-J, Im S-Y, Park J-W, Choi E-J, Park H-S. 2008. Downregulation by lipopolysaccharide of Notch signaling, via nitric oxide. *J Cell Sci.* 121:1466-1476.
- Kim RY, Hoffman AS, Itoh N, Ao Y, Spence R, Sofroniew M V, Voskuhl RR. 2014. Astrocyte CCL2 sustains immune cell infiltration in chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol.* 274:53-61.
- Kipp M, Karakaya S, Johann S, Kampmann E, Mey J, Beyer C. 2007. Oestrogen and progesterone reduce lipopolysaccharide-induced expression of tumour necrosis factor-alpha and interleukin-18 in midbrain astrocytes. *J Neuroendocrinol.* 19:819-822.
- Kopan R, Ilagan MXG. 2009. The Canonical Notch Signaling Pathway: Unfolding the Activation Mechanism. *Cell.* 137:216-233.
- Kouroupi G, Lavdas AA, Gaitanou M, Thomaidou D, Stylianopoulou F, Matsas R. 2010. Lentivirus-mediated expression of insulin-like growth factor-I promotes neural stem/precursor cell proliferation and enhances their potential to generate neurons. *J Neurochem.* 115:460-474.
- Ladi E, Nichols JT, Ge W, Miyamoto A, Yao C, Yang L-T, Boulter J, Sun YE, Kintner C, Weinmaster G. 2005. The divergent DSL ligand Dll3 does not activate Notch signaling but cell autonomously attenuates signaling induced by other DSL ligands. *J Cell Biol.* 170:983-992.
- Lai AY, Todd KG. 2008. Differential regulation of trophic and proinflammatory microglial effectors is dependent on severity of neuronal injury. *Glia.* 56:259-270.

- Lavaque E, Mayen A, Azcoitia I, Tena-Sempere M, Garcia-Segura LM. 2006. Sex differences, developmental changes, response to injury and cAMP regulation of the mRNA levels of steroidogenic acute regulatory protein, cytochrome p450scc, and aromatase in the olivocerebellar system. *J Neurobiol.* 66:308-318.
- Lavaque E, Sierra a, Azcoitia I, Garcia-Segura LM. 2006. Steroidogenic acute regulatory protein in the brain. *Neuroscience.* 138:741-747.
- Le Bras S, Loyer N, Le Borgne R. 2011. The multiple facets of ubiquitination in the regulation of notch signaling pathway. *Traffic.* 12:149-161.
- Lee ESY, Sidoryk M, Jiang H, Yin Z, Aschner M. 2009. Estrogen and tamoxifen reverse manganese-induced glutamate transporter impairment in astrocytes. *J Neurochem.* 110:530-544.
- Lee HM, Jr GHG, Englander EW. 2011. Free Radical Biology & Medicine Transgenic overexpression of neuroglobin attenuates formation of smoke- inhalation-induced oxidative DNA damage , in vivo , in the mouse brain. *Free Radic Biol Med.* 51:2281-2287.
- Lenz KM, McCarthy MM. 2014. A Starring Role for Microglia in Brain Sex Differences. *Neuroscientist.* In press.
- Lenz KM, Nugent BM, McCarthy MM. 2012. Sexual differentiation of the rodent brain: dogma and beyond. *Front Neurosci.* 6:26.
- Lewis DK, Johnson AB, Stohlgren S, Harms A, Sohrabji F. 2008. Effects of estrogen receptor agonists on regulation of the inflammatory response in astrocytes from young adult and middle-aged female rats. *J Neuroimmunol.* 195:47-59.
- Li C, Zhao R, Gao K, Wei Z, Yin MY, Lau LT, Chui D, Hoi Yu AC. 2011. Astrocytes: implications for neuroinflammatory pathogenesis of Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res.* 8:67-80.
- Li W-D, Sun Q, Zhang X-S, Wang C-X, Li S, Li W, Hang C-H. 2014. Expression and cell distribution of neuroglobin in the brain tissue after experimental subarachnoid hemorrhage in rats: a pilot study. *Cell Mol Neurobiol.* 34:247-255.
- Liao C-K, Jeng C-J, Wang H-S, Wang S-H, Wu J-C. 2013. Lipopolysaccharide induces degradation of connexin43 in rat astrocytes via the ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *PLoS One.* 8:e79350.
- Liquitaya-Montiel A, Aguilar-Arredondo A, Arias C, Zepeda A. 2012. Insulin growth factor-I promotes functional recovery after a focal lesion in the dentate gyrus. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 11:818-828.
- Liu M, Hurn PD, Roselli CE, Alkayed NJ. 2007. Role of P450 aromatase in sex-specific astrocytic cell death. *J Cereb Blood Flow Metab.* 27:135-141.
- Liu M, Oyarzabal EA, Yang R, Murphy SJ, Hurn PD. 2008. A novel method for assessing sex-specific and genotype-specific response to injury in astrocyte culture. *J Neurosci Methods.* 171:214-217.

- Llorens-Martín M, Torres-Alemán I, Trejo JL. 2010. Exercise modulates insulin-like growth factor 1-dependent and -independent effects on adult hippocampal neurogenesis and behaviour. *Mol Cell Neurosci*. 44:109-117.
- López Rodríguez AB, Mateos Vicente B, Romero-Zerbo SY, Rodríguez-Rodríguez N, Bellini MJ, Rodríguez de Fonseca F, Bermudez-Silva FJ, Azcoitia I, García-Segura LM, Viveros M-P. 2011. Estradiol decreases cortical reactive astrogliosis after brain injury by a mechanism involving cannabinoid receptors. *Cereb Cortex*. 21:2046-2055.
- Lopez-Rodriguez AB, Acáz-Fonseca E, Giatti S, Caruso D, P; VM, Melcangi RC, García-Segura L. 2015. Correlation of brain and plasma levels of neuroactive steroids with neurological deficit after traumatic brain injury. *Psychoneuroendocrinology*. Under Revi.
- Lugert S, Basak O, Knuckles P, Haussler U, Fabel K, Götz M, Haas CA, Kempermann G, Taylor V, Giachino C. 2010. Quiescent and active hippocampal neural stem cells with distinct morphologies respond selectively to physiological and pathological stimuli and aging. *Cell Stem Cell*. 6:445-456.
- Lundkvist J, Lendahl U. 2001. Notch and the birth of glial cells. *Trends Neurosci*. 24:492-494.
- Mairet-Coello G, Tury A, DiCicco-Bloom E. 2009. Insulin-like growth factor-1 promotes G(1)/S cell cycle progression through bidirectional regulation of cyclins and cyclin-dependent kinase inhibitors via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in developing rat cerebral cortex. *J Neurosci*. 29:775-788.
- McElroy B, Powell JC, McCarthy J V. 2007. The insulin-like growth factor 1 (IGF-1) receptor is a substrate for gamma-secretase-mediated intramembrane proteolysis. *Biochem Biophys Res Commun*. 358:1136-1141.
- Meister B, Perez-Manso M, Daraio T. 2013. Delta-like 1 homologue is a hypothalamus-enriched protein that is present in orexin-containing neurones of the lateral hypothalamic area. *J Neuroendocrinol*. 25:617-625.
- Mendez P, Azcoitia I ñigo, García-Segura LM. 2003. Estrogen receptor alpha forms estrogen-dependent multimolecular complexes with insulin-like growth factor receptor and phosphatidylinositol 3-kinase in the adult rat brain. *Mol Brain Res*. 112:170-176.
- Mirzamani A, Spence RD, Naranjo KC, Saldanha CJ, Schlinger B a. 2010. Injury-induced regulation of steroidogenic gene expression in the cerebellum. *J Neurotrauma*. 27:1875-1882.
- Mong JA, Nuñez JL, McCarthy MM. 2002. GABA mediates steroid-induced astrocyte differentiation in the neonatal rat hypothalamus. *J Neuroendocrinol*. 14:45-55.
- Morton GJ, Cummings DE, Baskin DG, Barsh GS, Schwartz MW. 2006. Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature*. 443:289-295.
- Mouton PR, Long JM, Lei D-L, Howard V, Jucker M, Calhoun ME, Ingram DK. 2002. Age and gender effects on microglia and astrocyte numbers in brains of mice. *Brain Res*. 956:30-35.

- Murta D, Batista M, Silva E, Trindade A, Mateus L, Duarte A, Lopes-da-Costa L. 2014. Differential expression of Notch component and effector genes during ovarian follicle and corpus luteum development during the oestrous cycle. *Reprod Fertil Dev*. In press.
- Nakamura T, Miyagawa S, Katsu Y, Sato T, Iguchi T, Ohta Y. 2012. Sequential changes in the expression of Wnt- and Notch-related genes in the vagina and uterus of ovariectomized mice after estrogen exposure. *In Vivo*. 26:899-906.
- Nieto-Bona MP, Garcia-Segura LM, Torres-Alemán I. 1997. Transynaptic modulation by insulin-like growth factor I of dendritic spines in Purkinje cells. *Int J Dev Neurosci*. 15:749-754.
- Nomura Y. 2001. NF- κ B activation and I κ B α dynamism involved in iNOS and chemokine induction in astroglial cells. *Life Sci*. 68:1695-1701.
- Noonan CW, Kathman SJ, White MC. 2002. Prevalence estimates for MS in the United States and evidence of an increasing trend for women. *Neurology*. 58:136-138.
- Noorbakhsh F, Baker GB, Power C. 2014. Allopregnanolone and neuroinflammation: a focus on multiple sclerosis. *Front Cell Neurosci*. 8:134.
- Nye JS, Kopan R, Axel R. 1994. An activated Notch suppresses neurogenesis and myogenesis but not gliogenesis in mammalian cells. *Development*. 2430:2421-2430.
- O'Donnell ME, Lam TI, Tran LQ, Foroutan S, Anderson SE. 2006. Estradiol reduces activity of the blood-brain barrier Na-K-Cl cotransporter and decreases edema formation in permanent middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab*. 26:1234-1249.
- Orton SM, Herrera BM, Yee IM, Valdar W, Ramagopalan S V., Sadovnick AD, Ebers GC. 2006. Sex ratio of multiple sclerosis in Canada: a longitudinal study. *Lancet Neurol*. 5:932-936.
- Osipo C, Golde TE, Osborne B a, Miele L a. 2008. Off the beaten pathway: the complex cross talk between Notch and NF-kappaB. *Lab Invest*. 88:11-17.
- Panzica GC, Balthazart J, Frye C a, Garcia-Segura LM, Herbison AE, Mensah-Nyagan AG, McCarthy MM, Melcangi RC. 2012. Milestones on Steroids and the Nervous System: 10 years of basic and translational research. *J Neuroendocrinol*. 24:1-15.
- Paxinos G, Franklin KBJ. 2004. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. Gulf Professional Publishing, Boston.
- Pekny M, Nilsson M. 2005. Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia*. 50:427-434.
- Pekny M, Wilhelmsson U, Pekna M. 2014. The dual role of astrocyte activation and reactive gliosis. *Neurosci Lett*. 565:30-38.
- Peng L, Parpura V, Verkhratsky A. 2014. EDITORIAL Neuroglia as a Central Element of Neurological Diseases: An Underappreciated Target for Therapeutic Intervention. *Curr Neuropharmacol*. 12:303-307.

- Peruffo A, Buson G, Cozzi B, Ballarin C. 2008. Primary cell cultures from fetal bovine hypothalamus and cerebral cortex: a reliable model to study P450Arom and alpha and beta estrogen receptors in vitro. *Neurosci Lett.* 434:83-87.
- Petrovic J, Formosa-Jordan P, Luna-Escalante JC, Abelló G, Ibañes M, Neves J, Giraldez F. 2014. Ligand-dependent Notch signaling strength orchestrates lateral induction and lateral inhibition in the developing inner ear. *Development.* 141:2313-2324.
- Platania P, Seminara G, Aronica E, Troost D, Catania MV, Sortino MA. 2005. 17beta-estradiol rescues spinal motoneurons from AMPA-induced toxicity: A role for glial cells. *Neurobiol Dis.* 20:461-470.
- Poser SW, Park DM, Androutsellis-Theotokis A. 2013. The STAT3-Ser/Hes3 signaling axis: an emerging regulator of endogenous regeneration and cancer growth. *Front Physiol.* 4:273.
- Pupo M, Pisano A, Abonante S, Maggiolini M, Musti AM. 2014. GPER activates Notch signaling in breast cancer cells and cancer-associated fibroblasts (CAFs). *Int J Biochem Cell Biol.* 46:56-67.
- Qiu J, Rønnekleiv OK, Kelly MJ. 2008. Modulation of hypothalamic neuronal activity through a novel G-protein-coupled estrogen membrane receptor. *Steroids.* 73:985-991.
- Racchetti G, D'Alessandro R, Meldolesi J. 2012. Astrocyte stellation, a process dependent on Rac1 is sustained by the regulated exocytosis of enlargeosomes. *Glia.* 60:465-475.
- Reddy DS. 2014. Neurosteroids and their role in sex-specific epilepsies. *Neurobiol Dis.* 72PB:198-209.
- Reuss S, Saaler-Reinhardt S, Weich B, Wystub S, Reuss M., Burmester T, Hankeln T. 2002. Expression analysis of neuroglobin mRNA in rodent tissues. *Neuroscience.* 115:645-656.
- Revankar CM, Cimino DF, Sklar LA, Arterburn JB, Prossnitz ER. 2005. A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science.* 307:1625-1630.
- Ridet JL, Malhotra SK, Privat a, Gage FH. 1997. Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. *Trends Neurosci.* 20:570-577.
- Rius J, Guma M, Schachtrup C, Akassoglou K, Zinkernagel AS, Nizet V, Johnson RS, Haddad GG, Karin M. 2008. NF-kappaB links innate immunity to the hypoxic response through transcriptional regulation of HIF-1alpha. *Nature.* 453:807-811.
- Rizzo P, Miao H, D'Souza G, Osipo C, Song LL, Yun J, Zhao H, Mascarenhas J, Wyatt D, Antico G, Hao L, Yao K, Rajan P, Hicks C, Siziopikou K, Selvaggi S, Bashir A, Bhandari D, Marchese A, Lendahl U, Qin J-Z, Tonetti D a, Albain K, Nickoloff BJ, Miele L. 2008. Cross-talk between notch and the estrogen receptor in breast cancer suggests novel therapeutic approaches. *Cancer Res.* 68:5226-5235.
- Robel S, Berninger B, Götz M. 2011. The stem cell potential of glia: lessons from reactive gliosis. *Nat Rev Neurosci.* 12:88-104.

- Robertson CL, Puskar A, Hoffman GE, Murphy AZ, Saraswati M, Fiskum G. 2006. Physiologic progesterone reduces mitochondrial dysfunction and hippocampal cell loss after traumatic brain injury in female rats. *Exp Neurol*. 197:235-243.
- Rolls A, Shechter R, London A, Segev Y, Jacob-Hirsch J, Amariglio N, Rechavi G, Schwartz M. 2008. Two faces of chondroitin sulfate proteoglycan in spinal cord repair: a role in microglia/macrophage activation. *PLoS Med*. 5:e171.
- Rolls A, Shechter R, Schwartz M. 2009. The bright side of the glial scar in CNS repair. *Nat Rev Neurosci*. 10:235-241.
- Ronchini C, Capobianco AJ. 2001. Induction of cyclin D1 transcription and CDK2 activity by Notch(ic): implication for cell cycle disruption in transformation by Notch(ic). *Mol Cell Biol*. 21:5925-5934.
- Roof RL, Duvdevani R, Braswell L, Stein DG. 1994. Progesterone facilitates cognitive recovery and reduces secondary neuronal loss caused by cortical contusion injury in male rats. *Exp Neurol*. 129:64-69.
- Ruiz-Larrea MB, Martín C, Martínez R, Navarro R, Lacort M, Miller NJ. 2000. Antioxidant activities of estrogens against aqueous and lipophilic radicals; differences between phenol and catechol estrogens. *Chem Phys Lipids*. 105:179-188.
- Ruiz-Palmero I, Hernando M, Garcia-Segura LM, Arevalo M-A. 2013. G protein-coupled estrogen receptor is required for the neurotogenic mechanism of 17 β -estradiol in developing hippocampal neurons. *Mol Cell Endocrinol*. 372:105-115.
- Ruiz-Palmero I, Simon-Areces J, Garcia-Segura LM, Arevalo M. 2011. Notch/neurogenin 3 signalling is involved in the neurotogenic actions of oestradiol in developing hippocampal neurones. *J Neuroendocrinol*. 23:355-364.
- Sanalkumar R, Dhanesh SB, James J. 2010. Non-canonical activation of Notch signaling/target genes in vertebrates. *Cell Mol Life Sci*. 67:2957-2968.
- Sánchez-Solana B, Nueda ML, Ruvira MD, Ruiz-Hidalgo MJ, Monsalve EM, Rivero S, García-Ramírez JJ, Díaz-Guerra MJM, Baladrón V, Laborda J. 2011. The EGF-like proteins DLK1 and DLK2 function as inhibitory non-canonical ligands of NOTCH1 receptor that modulate each other's activities. *Biochim Biophys Acta*. 1813(6):1153-1164.
- Santos-Galindo M, Acas-Fonseca E, Bellini MJ, Garcia-Segura LM. 2011. Sex differences in the inflammatory response of primary astrocytes to lipopolysaccharide. *Biol Sex Differ*. 2:7.
- Saraceno GE, Bertolino MLA, Galeano P, Romero JI, Garcia-Segura LM, Capani F. 2010. Estradiol therapy in adulthood reverses glial and neuronal alterations caused by perinatal asphyxia. *Exp Neurol*. 223:615-622.
- Schwartz M, Shechter R. 2010. Systemic inflammatory cells fight off neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol*. 6:405-410.
- Schwarz JM, Bilbo SD. 2012. Sex, glia, and development: interactions in health and disease. *Horm Behav*. 62:243-253.

- Schwarz JM, Sholar PW, Bilbo SD. 2012. Sex differences in microglial colonization of the developing rat brain. *J Neurochem.* 120:948-963.
- Schweisguth F. 2004. Regulation of Notch Signaling Activity. *Curr Biol.* 14:R129-R138.
- Schwendimann RN, Alekseeva N. 2007. Gender Issues in Multiple Sclerosis. *Int Rev Neurobiol.* 79:377-392.
- Sehat B, Tofigh A, Lin Y, Trocmé E, Liljedahl U, Lagergren J, Larsson O. 2010. SUMOylation mediates the nuclear translocation and signaling of the IGF-1 receptor. *Sci Signal.* 3:ra10.
- Selenica M-LB, Alvarez J a, Nash KR, Lee DC, Cao C, Lin X, Reid P, Mouton PR, Morgan D, Gordon MN. 2013. Diverse activation of microglia by chemokine (C-C motif) ligand 2 overexpression in brain. *J Neuroinflammation.* 10:86.
- Shaye DD, Greenwald I. 2005. LIN-12/Notch trafficking and regulation of DSL ligand activity during vulval induction in *Caenorhabditis elegans*. *Development.* 132:5081-5092.
- Shechter R, Schwartz M. 2013. Harnessing monocyte-derived macrophages to control central nervous system pathologies: no longer “if” but “how”. *J Pathol.* 229:332-346.
- Shulman LM, Bhat V. 2006. Gender disparities in Parkinson’s disease. *Expert Rev Neurother.* 6:407-416.
- Simpson ER, Mahendroo MS, Means GD, Kilgore MW, Hinshelwoodf MM, Graham-lorence S, Amarneh B, Ito Y, Fisher CR, Michael MD, Mendelson CR, Bulun SE. 1994. Aromatase Cytochrome P450, the enzyme responsible for Estrogen Biosynthesis. *Endocr Rev.* 15:342-355.
- Singh M, Su C, Ng S. 2013. Non-genomic mechanisms of progesterone action in the brain. *Front Neurosci.* 7:1-7.
- Sladek FM. 2011. What are nuclear receptor ligands? *Mol Cell Endocrinol.* 334:3-13.
- Smith CL, O’Malley BW. 2004. Coregulator function: a key to understanding tissue specificity of selective receptor modulators. *Endocr Rev.* 25:45-71.
- Soares R, Balogh G, Guo S, Gärtner F, Russo J, Schmitt F. 2004. Evidence for the notch signaling pathway on the role of estrogen in angiogenesis. *Mol Endocrinol.* 18:2333-2343.
- Sobrinho A, Mata M, Laguna-Fernandez A, Novella S, Oviedo PJ, García-Pérez MA, Tarín JJ, Cano A, Hermenegildo C. 2009. Estradiol stimulates vasodilatory and metabolic pathways in cultured human endothelial cells. *PLoS One.* 4:e8242.
- Sofroniew M V. 2009. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci.* 32:638-647.
- Sofroniew M V, Vinters H V. 2010. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol.* 119:7-35.

- Sortino MA, Chisari M, Merlo S, Vancheri C, Caruso M, Nicoletti F, Canonico PL, Copani A. 2004. Glia mediates the neuroprotective action of estradiol on beta-amyloid-induced neuronal death. *Endocrinology*. 145:5080-5086.
- Spence RD, Hamby ME, Umeda E, Itoh N, Du S, Wisdom AJ, Cao Y, Bondar G, Lam J, Ao Y, Sandoval F, Suriany S, Sofroniew M V, Voskuhl RR. 2011. Neuroprotection mediated through estrogen receptor-alpha in astrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 108:8867-8872.
- Sprinzak D, Lakhanpal A, Lebon L, Santat LA, Fontes ME, Anderson GA, Garcia-ojalvo J, Elowitz MB. 2010. Cis Interactions between Notch and Delta Generate Mutually Exclusive Signaling States. *Nature*. 465:86-90.
- Stanić D, Dubois S, Chua HK, Tonge B, Rinehart N, Horne MK, Boon WC. 2014. Characterization of aromatase expression in the adult male and female mouse brain. I. Coexistence with oestrogen receptors α and β , and androgen receptors. *PLoS One*. 9:e90451.
- Stanley P, Okajima T. 2010. Roles of glycosylation in notch signaling, *Current Topics in Developmental Biology*. 92:131-164.
- Steen E, Terry BM, Rivera EJ, Cannon JL, Neely TR, Tavares R, Xu XJ, Wands JR, de la Monte SM. 2005. Impaired insulin and insulin-like growth factor expression and signaling mechanisms in Alzheimer's disease--is this type 3 diabetes? *J Alzheimers Dis*. 7:63-80.
- Stein DG. 2001. Brain damage, sex hormones and recovery: a new role for progesterone and estrogen? *Trends Neurosci*. 24:386-391.
- Stein DG. 2013. A clinical/translational perspective: can a developmental hormone play a role in the treatment of traumatic brain injury? *Horm Behav*. 63:291-300.
- Stirone C, Duckles SP, Krause DN. 2003. Multiple forms of estrogen receptor-alpha in cerebral blood vessels: regulation by estrogen. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 284:E184-E192.
- Stockhausen M-T, Sjölund J, Axelson H. 2005. Regulation of the Notch target gene Hes-1 by TGFalpha induced Ras/MAPK signaling in human neuroblastoma cells. *Exp Cell Res*. 310:218-228.
- Takahashi N, Watanabe S, Wakasugi K. 2013. Crucial roles of Glu60 in human neuroglobin as a guanine nucleotide dissociation inhibitor and neuroprotective agent. *PLoS One*. 8:e83698.
- Tapia-Gonzalez S, Carrero P, Pernia O, Garcia-Segura LM, Diz-Chaves Y. 2008. Selective oestrogen receptor (ER) modulators reduce microglia reactivity in vivo after peripheral inflammation: Potential role of microglial ERs. *J Endocrinol*. 198:219-230.
- Tarassishin L, Suh H-S, Lee SC. 2014. LPS and IL-1 differentially activate mouse and human astrocytes: role of CD14. *Glia*. 62:999-1013.
- Theriault E, Frankenstein UN, Hertzberg EL, Nagy JI. 1997. Connexin43 and astrocytic gap junctions in the rat spinal cord after acute compression injury. *J Comp Neurol*. 382:199-214.

- Toran-Allerand CD, Guan X, MacLusky NJ, Horvath TL, Diano S, Singh M, Connolly ES, Nethrapalli IS, Tinnikov AA. 2002. ER-X: a novel, plasma membrane-associated, putative estrogen receptor that is regulated during development and after ischemic brain injury. *J Neurosci.* 22:8391-8401.
- Toran-Allerand CD, Singh M, Sétáló G. 1999. Novel mechanisms of estrogen action in the brain: new players in an old story. *Front Neuroendocrinol.* 20:97-121.
- Torres-Aleman I, Pons S, Arevalo MA. 1994. The insulin-like growth factor I system in the rat cerebellum: developmental regulation and role in neuronal survival and differentiation. *J Neurosci Res.* 39:117-126.
- Tsapournioti S, Mylonis I, Hatziefthimiou A, Ioannou MG, Stamatiou R, Koukoulis GK, Simos G, Molyvdas P-A, Paraskeva E. 2013. TNF α induces expression of HIF-1 α mRNA and protein but inhibits hypoxic stimulation of HIF-1 transcriptional activity in airway smooth muscle cells. *J Cell Physiol.* 228:1745-1753.
- Van Neerven S, Regen T, Wolf D, Nemes A, Johann S, Beyer C, Hanisch U-K, Mey J. 2010. Inflammatory chemokine release of astrocytes in vitro is reduced by all-trans retinoic acid. *J Neurochem.* 114:1511-1526.
- Vierk R, Glassmeier G, Zhou L, Brandt N, Fester L, Dudzinski D, Wilkars W, Bender RA, Lewerenz M, Gloger S, Graser L, Schwarz J, Rune GM. 2012. Aromatase Inhibition Abolishes LTP Generation in Female But Not in Male Mice. *J Neurosci.* 32:8116-8126.
- Voskuhl RR, Peterson RS, Song B, Ao Y, Morales LBJ, Tiwari-Woodruff S, Sofroniew M V. 2009. Reactive astrocytes form scar-like perivascular barriers to leukocytes during adaptive immune inflammation of the CNS. *J Neurosci.* 29:11511-11522.
- Walter HJ, Berry M, Hill DJ, Logan A, Birmingham B. 1997. Spatial and Temporal Changes in the Insulin-Like Growth Factor (IGF) Axis Indicate Autocrine / Paracrine Actions of IGF-I within Wounds of the Rat Brain *. *Endocrinology.* 138:3024-3034.
- Wang H, Zang C, Liu XS, Aster JC. 2014. The Role of Notch Receptors in Transcriptional Regulation. *J Cell Physiol.* 1-23.
- Wang MM. 2011. Notch signaling and Notch signaling modifiers. *Int J Biochem Cell Biol.* 43:1550-1562.
- Wang Z, Li Y, Kong D, Ahmad A, Banerjee S, Sarkar FH. 2010. Cross-talk between miRNA and Notch signaling pathways in tumor development and progression. *Cancer Lett.* 292:141-148.
- Wanner IB, Anderson M a, Song B, Levine J, Fernandez A, Gray-Thompson Z, Ao Y, Sofroniew M V. 2013. Glial scar borders are formed by newly proliferated, elongated astrocytes that interact to corral inflammatory and fibrotic cells via STAT3-dependent mechanisms after spinal cord injury. *J Neurosci.* 33:12870-12886.
- Wei Z, Chigurupati S, Arumugam T V, Jo D-G, Li H, Chan SL. 2011. Notch activation enhances the microglia-mediated inflammatory response associated with focal cerebral ischemia. *Stroke.* 42:2589-2594.

- Wilhelmsson U, Faiz M, de Pablo Y, Sjöqvist M, Andersson D, Widestrand A, Potokar M, Stenovec M, Smith PLP, Shinjyo N, Pekny T, Zorec R, Ståhlberg A, Pekna M, Sahlgren C, Pekny M. 2012. Astrocytes negatively regulate neurogenesis through the Jagged1-mediated Notch pathway. *Stem Cells*. 30:2320-2329.
- Wongchana W, Palaga T. 2012. Direct regulation of interleukin-6 expression by Notch signaling in macrophages. *Cell Mol Immunol*. 9:155-162.
- Yamamoto S, Charng W-L, Bellen HJ. 2010. Endocytosis and intracellular trafficking of Notch and its ligands. *Curr Top Dev Biol*. 92:165-200.
- Yang S-A, Wang W-D, Chen C-T, Tseng C-Y, Chen Y-N, Hsu H-J. 2013. FOXO/Fringe is necessary for maintenance of the germline stem cell niche in response to insulin insufficiency. *Dev Biol*. 382:124-135.
- Yao L, Kan EM, Kaur C, Dheen ST, Hao A, Lu J, Ling E-A. 2013. Notch-1 signaling regulates microglia activation via NF- κ B pathway after hypoxic exposure in vivo and in vitro. *PLoS One*. 8:e78439.
- Zhang H, Nøhr J, Jensen CH, Petersen RK, Bachmann E, Teisner B, Larsen LK, Mandrup S, Kristiansen K. 2003. Insulin-like growth factor-1/insulin bypasses Pref-1/FA1-mediated inhibition of adipocyte differentiation. *J Biol Chem*. 278:20906-20914.
- Zhao S-T, Zhao L, Li J-H. 2013. Neuroprotective Peptide humanin inhibits inflammatory response in astrocytes induced by lipopolysaccharide. *Neurochem Res*. 38:581-588.